

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)
27 January 1998 (27.01.98)

International application No.
PCT/EP97/03187

Applicant's or agent's file reference
G 7116

International filing date (day/month/year)
18 June 1997 (18.06.97)

Priority date (day/month/year)
25 June 1996 (25.06.96)

Applicant

SCHUBERT, Roland et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

12 January 1998 (12.01.98)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Céline Faust

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MAIWALD, Walter
Maiwald GmbH
Poccistrasse 11
D-80336 München
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year)

27 January 1998 (27.01.98)

Applicant's or agent's file reference

G 7116

International application No.

PCT/EP97/03187

IMPORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year)

18 June 1997 (18.06.97)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐

the applicant

☐

the inventor

☒

the agent

☐

the common representative

Name and Address

MAIWALD, Walter
Maiwald & Partner
Poccistrasse 11
D-80336 München
Germany

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

(089) 74 72 66-0

Facsimile No.

(089) 77 64 24

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐

the person

☒

the name

☐

the address

☐

the nationality

☐

the residence

Name and Address

MAIWALD, Walter
Maiwald GmbH
Poccistrasse 11
D-80336 München
Germany

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

(089) 74 72 66-0

Facsimile No.

(089) 77 64 24

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒

the receiving Office

☐

the International Searching Authority

☒

the International Preliminary Examining Authority

☐

the designated Offices concerned

☒

the elected Offices concerned

☐

other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Céline Faust

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
DOCUMENT TRANSMITTED

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

04 February 1999 (04.02.99)

International application No.

PCT/EP97/03187

International filing date (day/month/year)

18 June 1997 (18.06.97)

Applicant

GSF - FORSCHUNGSZENTRUM FÜR UMWELT UND GESUNDHEIT GMBH et al

The International Bureau transmits herewith the following documents and number thereof:

_____ copy of the English translation of the international preliminary examination report (Article 36(3)(a))

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

C. Carrié

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

M

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference G 7116	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP97/03187	International filing date (day/month/year) 18 June 1997 (18.06.1997)	Priority date (day/month/year) 25 June 1996 (25.06.1996)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/82, C12Q 1/68, A01H 5/00		
Applicant GSF - FORSCHUNGSZENTRUM FÜR UMWELT UND GESUNDHEIT		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 6 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 12 January 1998 (12.01.1998)	Date of completion of this report 17 September 1998 (17.09.1998)
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office D-80298 Munich, Germany Facsimile No. 49-89-2399-4465	Authorized officer Telephone No. 49-89-2399-0

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP97/03187

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

☐ the international application as originally filed.

☒ the description, pages 1 - 36, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.

☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. 1 - 37, filed with the letter of 01.07.1998,
 Nos. _____, filed with the letter of _____.

☐ the drawings, sheets/fig _____, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____
☐ the claims, Nos. _____
☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 97/03187

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement			
Novelty (N)	Claims	1 - 37	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1 - 4, 8 - 10, 15 - 18, 23 - 37	YES
	Claims	5, 6, 7, 11 - 14, 19, 20, 21, 22	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 37	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. This report refers to the following search report citation (D):

D1: Doktorarbeit Universität Hohenheim, Stuttgart
XP 002045218, December 1994

2. Claims 1 to 3 concern a specific promotor fragment which consists of the base pairs -270 to -430 of the stilbene synthase gene. That fragment is responsible for ozone-induced gene expression in plants (ozone-responsive DNA sequence region).

That DNA section is novel and inventive with respect to the relevant document, D1.

Although D1 also describes shortened forms of the Vst-1 promotor (page 90, Table 11) which are fused with the GUS gene, those forms do not consist specifically of the selected -430 to -270 region, but still contain the region downstream of -280 to the beginning of the stilbene synthase gene promotor sequence.

D1 also does not indicate that the region between -430 and -270 might be responsible for the regulation by ozone.

Therefore homologous fragments derived therefrom and having the same function are also acceptable (Claim 4).

The same applies to dependent Claims 15 to 18 and 23, process Claims 24 to 33 and use Claims 34 to 36.

3. Claim 5 is indeed novel over D1 because it excludes certain deletion regions.

However, on the basis of the teaching of D1, that claim is not inventive. The claimed promotor region includes the promotor region of the stilbene synthase gene Vst1 from the grapevine, at least the region upstream of -270 being absent. These promotor constructs differ from deletion mutant -280 of D1 (page 31, Figure 13, and page 90, Table 11) by 10 bp.

D1 already discloses that the promotor region downstream of -280 is responsible for pathogen inducibility (page 122, paragraph 3, lines 1 to 3). A promotor fragment which is thus only 10 bp shorter than the one described and has no special effect in comparison with the already known promotor fragment cannot be considered inventive. Both the claimed promotor and the one described in D1 are namely pathogen-inducible and neither promotor is per se ozone-regulatable. The promotor region described in D1 (-280 downstream) is thus functionally no different from the claimed promotor, and so they can be considered equivalent. The determination of an inherent property of subject matter which was already obvious cannot render this subject matter either novel or inventive.

The same applies to dependent Claims 6, 7, 11 to 14, 19, 20, 21 and 22.

However, an inventive step is involved in a use of

the promotor (Claim 37) and a process (Claims 24 to 33, cf. point 2).

4. The subjects of Claims 8 to 10 can be differentiated from the "chimeric" nucleic acids described in D1 (page 90, Table 11). Although they also contain at least parts (fragments) of the -430 to -270 region, the deletion mutants of D1 contain 3' regions, while this is excluded with the nucleic acids of Claims 8 to 10. Therefore novelty and inventive step are substantiated, as in point 2 above.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

09/202634

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT 09/202634

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts G 7116	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 97/03187	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 18/06/1997	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 25/06/1996
Anmelder GSF-FORSCHUNGSZENTRUM FÜR UMWELT & et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).
2. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).
3. ☒ In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt,
 - ☒ das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde.
 - ☐ das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde,
 - ☐ dem jedoch keine Erklärung beigelegt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.
 - ☐ das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.
4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung
 - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
 - ☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt.
5. Hinsichtlich der Zusammenfassung
 - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
 - ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.
6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:

Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 6 C12N15/82 C12Q1/68 A01H5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C12Q A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FISCHER R.: "Optimierung der heterologen Expression von Stilbensynthasegenen für den Pflanzenschutz" Dezember 1994, DOKTORARBEIT UNIVERSITÄT HOHENHEIM, STUTTGART XP002045218 in der Anmeldung erwähnt * siehe das ganze Dokument, bes. S. 90/91, 115 Z. 10-15, 121-24 ---	1-22
A	ROSEMAN D. ET AL.: "Biochemical plant responses to ozone" PLANT PHYSIOLOGY, Bd. 97, Nr. 4, Dezember 1991, Seiten 1280-1286, XP002045215 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument --- -/-	1-36



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

30. Oktober 1997

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

11. 11. 97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Kania, T

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	KANGASJÄRVI, J. ET AL.: "Plant defence systems induced by ozone" PLANT, CELL AND ENVIRONMENT, Bd. 17, 1994, Seiten 783-794, XP002045216 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-36
P,X	SCHUBERT R. ET AL.: "An ozone-responsive region of the grapevine resveratrol synthase promoter differs from the basal pathogen-responsive sequence" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 34, Nr. 3, Juni 1997, Seiten 417-426, XP002045217 siehe das ganze Dokument -----	1-36

PATENT COOPERATION TREATY

09/202634

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

MAIWALD, Walter
Maiwald & Partner
Poccistrasse 11
D-80336 München
ALLEMAGNEMAIWALD & PARTNER
Patentanwälte - Rechtsanwälte

9. JAN. 1998

MÜNCHEN

FRIST

Date of mailing (day/month/year) 31 December 1997 (31.12.97)		
Applicant's or agent's file reference G 7116		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/EP97/03187	International filing date (day month year) 18 June 1997 (18.06.97)	Priority date (day/month/year) 25 June 1996 (25.06.96)
Applicant GSF - FORSCHUNGSZENTRUM FÜR UMWELT UND GESUNDHEIT GMBH et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AU, BR, CA, CN, EP, IL, JP, KP, KR, NO, PL, SK, US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
AL, AM, AP, AT, AZ, BA, BB, BG, BY, CH, CU, CZ, DE, DK, EA, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NZ, OA, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN
The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 31 December 1997 (31.12.97) under No. WO 97/49823

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

**NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF
THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES**

Date of mailing (day/month/year) 31 December 1997 (31.12.97)	IMPORTANT NOTICE
Applicant's or agent's file reference G 7116	International application No. PCT/EP97/03187

The applicant is hereby notified that, at the time of establishment of this Notice, the time limit under Rule 46.1 for making amendments under Article 19 has not yet expired and the International Bureau had received neither such amendments nor a declaration that the applicant does not wish to make amendments.

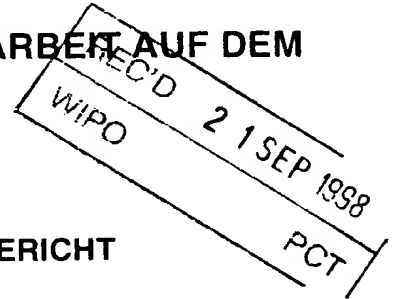
09/202634 19

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)





Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts G 7116	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP97/03187	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 18/06/1997	Priority date (Tag/Monat/Jahr) 25/06/1996
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/82		
Anmelder GSF-FORSCHUNGSZENTRUM FÜR UMWELT & et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 6 Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 12/01/1998	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 17.09.98
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. (+49-89) 2399-0. Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Bevollmächtigter Bediensteter Zellner, E Telefon (+49-89) 2399-8427 

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP97/03187

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-36 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-37 eingegangen am 01/07/1998 mit Schreiben vom 01/07/1998

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-37
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-4,8-10,15-18,23-37
	Nein: Ansprüche	5,6,7,11-14,19,20,21,22
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-37
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

1. In diesem Bescheid wird das folgende, im Recherchenbericht zitierte Dokument (D) genannt;:

D1: Doktorarbeit Universität Hohenheim, Stuttgart XP 002045218, Dezember 1994

2. Die Ansprüche 1-3 beziehen sich auf ein spezifisches Promotorfragment, daß aus den Basenpaaren -270 bis -430 des Stilbensynthasegens besteht. Dieses Fragment ist für die Ozon-induzierte Genexpression in Pflanzen verantwortlich (Ozon-responsiver DNA Sequenzbereich).

Dieser DNA Abschnitt ist im Hinblick auf das relevante Dokument D1 neu und erfinderisch.

D1 beschreibt zwar ebenfalls verkürzte Formen des Vst-1 Promotors (Seite 90, Tabelle 11), welche mit dem GUS-Gen fusioniert sind. Diese Formen bestehen aber nicht spezifisch aus dem ausgewählten Bereich -430 bis -270, sondern enthalten immer die Region stromabwärts von -280, bis zum Anfang der Promotorsequenz des Stilbensynthasegens.

Aus D1 geht auch nicht hervor, daß der Bereich zwischen -430 und -270 für die Regulierung durch Ozon verantwortlich sein könnte.

Somit sind auch davon abgeleitete homologe Fragmente mit der gleichen Funktion gewährbar (Anspruch 4).

Das Gleiche gilt für die davon abhängigen Ansprüche 15-18 und 23, die Verfahrensansprüche 24-33, sowie für die Verwendungsansprüche 34-36.

3. Der Anspruch 5 ist zwar durch das Ausschließen bestimmter Deletionsbereiche gegenüber D1 neu.

Dieser Anspruch ist jedoch aufgrund der Lehre von D1 nicht erfinderisch. Der beanspruchte Promotorbereich umfaßt die Promotorregion des Stilbensynthasegens Vst1 aus der Weinrebe, wobei mindestens der Bereich stromaufwärts von -270 fehlt. Diese Promotorkonstrukte unterscheiden sich von der Deletionsmutante -280 aus D1 (Seite 31, Abb. 13 und Seite 90, Tabelle 11) um 10 bp.

Aus D1 ist bereits bekannt, daß der Promotorbereich stromabwärts von -280 für die Pathogeninduzierbarkeit verantwortlich ist (Seite 122, 3. Absatz, Zeilen 1-3).

Ein Promotorfragment, daß also nur 10 bp kürzer ist als das beschriebene und keine besondere Wirkung im Vergleich zum bereits bekannten Promotorfragment aufweist, kann nicht als erfinderisch angesehen werden. Sowohl der beanspruchte Promotor als auch der in D1 beschriebene sind nämlich pathogenindizierbar und beide Promotoren sind per se nicht ozonregulierbar. Der in D1 beschriebene Promotorbereich (-280 stromabwärts) ist also funktionell nicht von dem beanspruchten Promotor zu unterscheiden, sie sind somit als äquivalent anzusehen. Die Bestimmung einer inhärenten Eigenschaft eines bereits nahegelegten Gegenstandes kann diesen Gegenstand weder neu noch erfinderisch machen.

Das Gleiche gilt für die davon abhängigen Ansprüche 6, 7, 11-14, 19, 20, 21 und 22.

Eine erfinderische Tätigkeit liegt jedoch vor in einer Verwendung des Promotors (Anspruch 37) oder in einem Verfahren (Ansprüche 24-33, siehe Punkt 2).

4. Die Ansprüche 8-10 sind von den "chimären" Nukleinsäuren die in D1 (Seite 90, Tabelle 11) beschrieben sind unterscheidbar. Diese enthalten zwar ebenfalls zumindest Teile (Fragmente) des Bereichs -430 bis -270, jedoch umfassen die Deletionsmutanten aus D1 3' Bereiche, während dies bei den Nukleinsäuren der Ansprüche 8 -10 ausgeschlossen ist. Neuheit und erfinderische Tätigkeit begründet sich also ebenso wie in Punkt 2 (siehe oben).

MAIWALD GMBH

PCT/EP97/03187

GSF / BAYER AG

01. Juli 1998

Neue Ansprüche 1-37

1. Die pflanzliche DNA-Sequenz:

ACTTTTCGAG CCCCTTGAAC TGGAAATTAA TACATTTTCC ACTTGACTTT
TGAAAAGGAG GCAATCCCAC GGGAGGGAAG CTGCTACCAA CCTTCGTAAT
GTAAATGAAA TCAAAGTCAC TCAATGTCCG AATTTCAAAC CTCANCAACC
CAATAGCCAA T.

2. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1, die aus Weinrebe (Vitis vinifera) stammt.

3. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder 2, die in dem Stilbensynthase-Gen Vst1 natürlicherweise enthalten ist und den Basenpaaren -270 bis -430 entspricht.

4. DNA-Sequenz, die zu der DNA-Sequenz gemäß einem der Ansprüche 1-3 eine Sequenzidentität von mindestens 40%, insbesondere von mindestens 60%, aufweist und in der Lage ist, eine Ozon-induzierbare Genexpression zu vermitteln, oder die ein Derivat oder eine allelische Variante der DNA-Sequenz gemäß einem der Ansprüche 1-3 ist und sich von dieser Sequenz durch natürlicherweise auftretende oder künstlich eingeführte Variationen, wie Deletionen, Insertionen, Substitutionen, Additionen, Rekombinationen, unterscheidet und in der Lage ist, eine Ozon-induzierbare Genexpression zu vermitteln.

5. Promoterregion des Stilbensynthasegens Vst1 aus Weinrebe, der mindestens die DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 fehlt, ausgenommen eine Promotorregion, die nur aus den 3' von Basenpaar -140 oder von Basenpaar -40 liegenden Basenpaaren besteht und in Fusion mit dem Reportergen β -Glucuronidase aus *E. coli* vorliegt.

6. Promoterregion gemäß Anspruch 5, die nur den Sequenzbereich vom Translationsstart bis Basenpaar -270 umfaßt.

AMENDED SHEET

AMENDED SHEET

MAIWALD GMBH

- 3 -

oder aufgrund des Fehlens mindestens eines Fragmentes davon keine Ozon-induzierbare Expression des natürlicherweise Ozon-induzierbaren Gens mehr aufweisen.

13. Pflanzen gemäß Anspruch 12, in denen die Ozon-induzierbare Expression von Krankheitsresistenzgenen stark reduziert ist.

14. Pflanzen gemäß Anspruch 12 oder 13, in denen die Ozon-induzierbare Expression von Stilbensynthasegenen, insbesondere des Vst1-Gens aus Weinrebe stark reduziert ist.

15. Pflanzen gemäß Anspruch 11, in denen aufgrund der Einführung der DNA-Sequenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 oder mindestens eines Fragmentes davon eine Ozon-induzierbare Genexpression eines natürlicherweise nicht über diese DNA-Sequenz verfügenden Gens stattfinden kann.

16. Pflanzen gemäß Anspruch 15, in denen Ozon-induzierbare Expression von solchen Genen stattfinden kann, deren Genprodukte in Pflanzenzellen in der Lage sind, reaktive Sauerstoffspezies zu entgiften.

17. Pflanzen gemäß Anspruch 15 oder 16, in denen Ozon-induzierbare Expression von Katalase- oder Superoxiddismutase-Genen stattfinden kann.

18. Pflanzen gemäß Anspruch 15, in denen Ozon-induzierbare Expression von Reportergenen stattfinden kann.

19. Dikotyle Pflanzen gemäß einem der Ansprüche 11 bis 18, insbesondere Nutzpflanzen, wie Sojabohne, Raps, Tomate, Zuckerrübe, Kartoffel, Baumwolle, Tabak, sowie Zierpflanzen oder Bäume.

AMENDED SHEET

MAIWALD GMBH

- 4 -

20. Monokotyle Pflanzen gemäß einem der Ansprüche 11 bis 18, insbesondere Getreide wie Hafer, Weizen, Roggen, Gerste, Reis, Hirse oder Mais.

21. Transgene Pflanzenzellen, einschließlich Protoplasten, die die DNA-Sequenz, eine Promoterregion oder ein chimäres Nukleinsäuremoleküle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10.

22. Pflanzenzellen, einschließlich Protoplasten, die aufgrund des Fehlens der (im natürlichen Zustand vorhandenen) DNA-Sequenz

ACTTTTCGAG CCCCTTGAAC TGGAAATTAA TACATTTTCC ACTTGACTTT
TGAAAAGGAG GCAATCCCAC GGGAGGGAAG CTGCTACCAA CCTTCGTAAT
GTTAATGAAA TCAAAGTCAC TCAATGTCCG AATTTCAAAC CTCANCAACC
CAATAGCCAA T

oder aufgrund des Fehlens mindestens eines Fragmentes davon keine Ozon-induzierbare Expression des natürlicherweise Ozon-induzierbaren Gens mehr aufweisen.

23. Pflanzenzellen gemäß Anspruch 21, in denen aufgrund der Einführung der DNA-Sequenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 oder mindestens eines Fragmentes davon eine Ozon-induzierbare Genexpression eines natürlicherweise nicht über diese DNA-Sequenz verfügenden Gens stattfinden kann.

24. Verfahren zur Erzeugung transgener Pflanzen bzw. Pflanzenzellen, in denen die Ozon-induzierbare Expression von natürlicherweise Ozon-induzierbaren Abwehrgenen durch Deletion der DNA-Sequenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 oder mindestens eines Fragmentes davon in dem Abwehrgen, das diese DNA-Sequenz natürlicherweise enthält, stark reduziert bzw. ausgeschaltet wird.

AMENDED SHEET

MAIWALD GMBH

- 5 -

25. Verfahren gemäß Anspruch 24, in denen die Ozon-induzierbare Expression von Stilbensynthasegenen stark reduziert bzw. ausgeschaltet wird.

26. Verfahren gemäß Anspruch 24 oder 25, in denen die Ozon-induzierbare Expression des Vst1-Gens aus Weinrebe stark reduziert bzw. ausgeschaltet wird.

27. Verfahren zur Erzeugung transgener Pflanzen bzw. Pflanzenzellen, in denen ein oder mehrere Gene, deren Expression natürlicherweise nicht oder nicht wesentlich durch Ozon induziert wird, aufgrund der Einführung der DNA-Sequenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 oder mindestens eines Fragmentes davon durch Ozon induzierbar sind.

28. Verfahren gemäß Anspruch 27, in denen ein oder mehrere Katalase- und/oder Superoxiddismutase-Gene durch Ozon induzierbar sind.

29. Verfahren gemäß Anspruch 27, in denen ein oder mehrere Reportergene durch Ozon induzierbar sind.

30. Verfahren zur Beseitigung der Ozon-Induzierbarkeit von natürlicherweise Ozon-induzierbaren Abwehrgenen, die die DNA-Sequenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 natürlicherweise enthalten, durch Deletion oder Inaktivierung der DNA-Sequenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 oder mindestens eines Fragmentes davon.

31. Verfahren gemäß Anspruch 30, in dem das Gen ein Stilbensynthase-Gen ist.

32. Verfahren gemäß Anspruch 30 oder 31, in dem das Gen das Vst1-Gen aus Weinrebe ist.

AMENDED SHEET

MAIWALD GMBH

- 6 -

33. Verfahren zur Erzeugung von Ozon-induzierbarer Merkmalsausprägung in transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen durch Einfügen der DNA-Sequenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 oder mindestens eines Fragmentes davon in solche Gene, die natürlicherweise nicht oder nicht wesentlich durch Ozon induzierbar sind.

34. Verwendung der DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder eines Fragmentes davon zur Auffindung Ozon-responsiver Sequenzbereiche in pflanzlichen Genen.

35. Verwendung der DNA-Sequenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 oder eines Fragments davon zur Erzeugung ozon-induzierbarer Merkmalsausprägung in transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen.

36. Verwendung der DNA-Sequenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 oder eines Fragments davon zur Erzeugung von Pflanzen gemäß Anspruch 18, die als Biomonitoren zur quantitativen und/oder qualitativen Bestimmung von Ozon-Konzentrationen eingesetzt werden können.

37. Verwendung der Promotorregion gemäß einem der Ansprüche 5 bis 7 zur Erzeugung erhöhter pathogen- aber nicht ozon-induzierbarer Krankheitsresistenz in transgenen Pflanzen.

AMENDED SHEET

PCT

WORLD ORGANIZATION FOR INTELLECTUAL PROPERTY
International Office

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED ACCORDING TO THE TREATY ON
INTERNATIONAL COLLABORATION REGARDING PATENTS (PCT)

International Patent Classification ⁶: C12N 15/82, C12Q 1/68, A01H 5/00

A1

- (11) International Publication No.: WO 97/49823
- (43) International Publication Date: December 31, 1997 (31.12.97)
- (21) International Reference No.: PCT/EP97/03187
- (22) International Application Date: June 18, 1997 (18.06.97)
- (30) Priority Dates:
- | | | |
|--------------|------------------------------|----|
| 196 25 330.6 | June 25, 1996 (25.06.96) | DE |
| 196 25 347.0 | June 25, 1996 (25.06.96) | DE |
| 196 35 569.9 | September 2, 1996 (02.09.96) | DE |
| 196 54 574.9 | December 27, 1996 (27.12.96) | DE |
- (71) Applicant (for all designated states except the US): GSF
- FORSCHUNGSZENTRUM FÜR UMWELT UND GESUNDHEIT GMBH [DE/DE];
Ingolstädter Landstrasse 1, D-85764 Oberschleißheim (DE).
BAYER AG [DE/DE]; D-51368 Leverkusen (DE).
- (72) Inventor; and
- (75) Inventor/Applicant (for the US only):
SCHUBERT, Roland [DE/DE]; Dachauer Strasse 479, D-80993 Munich
(DE). SANDERMANN, Heinrich [DE/DE]; Rottenbucherstrasse 36,
D-81377 Munich (DE). ERNST, Dietrich [DE/DE]; Am Schloßpark 28,
D-82131 Gauting (DE). HAIN, Rüdiger [DE/DE]; Talstrasse 53a,
D-40764 Langenfeld (DE). FISCHER, Regina [DE/DE]; Stockdorfer-
strasse 50, D-81475 Munich (DE).
- (74) Patent Attorney: MAIWALD, Walter; Maiwald & Partner, Poccistrasse 11,
D-80336 Munich (DE).

All Languages Ltd

(81) Designated States:

AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), European Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published: *With International Search Report. Prior to the expiry of the period allowed for amendments to the patent claims. To be re-published if changes are made.*

(54) Title: OZONE-INDUCED GENE EXPRESSION IN PLANTS

(57) Abstract *[Copied verbatim from the German original]*

The present invention relates to new DNA sequences, a method for producing new plants which contain a new DNA sequence, the coding sequence thereof being expressed after ozone induction. The invention also relates to said new plants and the use of DNA sequences to produce ozone-responsive gene expression in plants and plant cells. Moreover, it relates to a new promoter, the specificity thereof being increased by removal of the ozone response capacity thereof.

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

Codes to identify the PCT-contracting states which appear on standardized front pages of publications of international applications, according to the PCT.

AL	=	Albania	FI	=	Finland
AM	=	Armenia	FR	=	France
AT	=	Austria	GA	=	Gabon
AU	=	Australia	GB	=	United Kingdom
AZ	=	Azerbaijan	GE	=	Georgia
BA	=	Bosnia-Herzegovina	GH	=	Ghana
BB	=	Barbados	GN	=	Guinea
BE	=	Belgium	GR	=	Greece
BF	=	Burkina Faso	HU	=	Hungary
BG	=	Bulgaria	IE	=	Ireland
BJ	=	Benin	IL	=	Israel
BR	=	Brazil	IS	=	Iceland
BY	=	Belarus	IT	=	Italy
CA	=	Canada	JP	=	Japan
CF	=	Republic of Central Africa	KE	=	Kenya
CG	=	Congo	KG	=	Kirghizistan
CH	=	Switzerland	KP	=	People's Democratic Republic of Korea
CI	=	Ivory Coast	KR	=	Republic of Korea
CM	=	Cameroon	KZ	=	Kazakstan
CN	=	China	LC	=	St. Lucia
CU	=	Cuba	LI	=	Liechtenstein
CZ	=	Czech Republic	LK	=	Sri Lanka
DE	=	Germany	LR	=	Liberia
DK	=	Denmark	LS	=	Lesotho
EE	=	Estonia	LT	=	Lithuania
ES	=	Spain	LU	=	Luxembourg

All Languages Ltd

LV	=	Latvia	TT	=	Trinidad and Tobago
MC	=	Monaco	UA	=	The Ukraine
MD	=	Republic of Moldavia	UG	=	Uganda
MG	=	Madagascar	US	=	United States of America
MK	=	The former Yugoslavian Republic of Macedonia	UZ	=	Uzbekistan
ML	=	Mali	VN	=	Vietnam
MN	=	Mongolia	YU	=	Yugoslavia
MR	=	Mauritania	ZW	=	Zimbabwe
MW	=	Malawi			
MX	=	Mexico			
NE	=	Niger			
NL	=	The Netherlands			
NO	=	Norway			
NZ	=	New Zealand			
PL	=	Poland			
PT	=	Portugal			
RO	=	Rumania			
RU	=	Russian Federation			
SD	=	Sudan			
SE	=	Sweden			
SG	=	Singapore			
SI	=	Slovenia			
SK	=	Slovakia			
SN	=	Senegal			
SZ	=	Swaziland			
TD	=	Chad			
TG	=	Togo			
TJ	=	Tadjikistan			
TM	=	Turkmenistan			
TR	=	Turkey			

All Languages Ltd

Illustration 1

(b) Replacement Sheet (Rule 26)

-
- (a) GUS activity [$\text{pmol MU min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$]
- (b) 100 nL L^{-1} ozone
Control
200 nL L^{-1} ozone
Control
400 nL L^{-1} ozone
Control
- (c) Ozone gassing
- (d) Time (h)
- (e) Illustration 2
- (f) Replacement Sheet (Rule 26)

A. KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/82 C12Q1/68 A01H5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C12Q A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FISCHER R.: "Optimierung der heterologen Expression von Stilbensynthesegenen für den Pflanzenschutz" Dezember 1994, DOKTORARBEIT UNIVERSITÄT HOHENHEIM, STUTTGART XP002045218 in der Anmeldung erwähnt * siehe das ganze Dokument, bes. S. 90/91, 115 Z. 10-15, 121-24 ---	1-22
A	ROSEMAN D. ET AL.: "Biochemical plant responses to ozone" PLANT PHYSIOLOGY, Bd. 97, Nr. 4, Dezember 1991, Seiten 1280-1286, XP002045215 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-36
	--- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☐ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

30. Oktober 1997

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

11.11.97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Kania, T

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	KANGASJÄRVI, J. ET AL.: "Plant defence systems induced by ozone" PLANT, CELL AND ENVIRONMENT, Bd. 17, 1994, Seiten 783-794, XP002045216 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-36
P,X	SCHUBERT R. ET AL.: "An ozone-responsive region of the grapevine resveratrol synthase promoter differs from the basal pathogen-responsive sequence" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 34, Nr. 3, Juni 1997, Seiten 417-426, XP002045217 siehe das ganze Dokument -----	1-36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 97/03187

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/82 C12Q1/68 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C12Q A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FISCHER R.: "Optimierung der heterologen Expression von Stilbensynthesegenen für den Pflanzenschutz" December 1994, DOKTORARBEIT UNIVERSITÄT HOHENHEIM, STUTTGART XP002045218 cited in the application * see the whole document, especially page 90/91, 115 line 10-15, 121-124 ---	1-22
A	ROSEMAN D. ET AL.: "Biochemical plant responses to ozone" PLANT PHYSIOLOGY, vol. 97, no. 4, December 1991, pages 1280-1286, XP002045215 cited in the application see the whole document --- -/--	1-36



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 October 1997

Date of mailing of the international search report

11.11.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kania, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 97/03187

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
✓ A	KANGASJÄRVI, J. ET AL.: "Plant defence systems induced by ozone" PLANT, CELL AND ENVIRONMENT, vol. 17, 1994, pages 783-794, XP002045216 cited in the application see the whole document ---	1-36
P, X	SCHUBERT R. ET AL.: "An ozone-responsive region of the grapevine resveratrol synthase promoter differs from the basal pathogen-responsive sequence" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 34, no. 3, June 1997, pages 417-426, XP002045217 see the whole document -----	1-36



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/82, C12Q 1/68, A01H 5/00		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/49823 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 31. Dezember 1997 (31.12.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/03187 (22) Internationales Anmeldedatum: 18. Juni 1997 (18.06.97) (30) Prioritätsdaten: 196 25 330.6 25. Juni 1996 (25.06.96) DE 196 25 347.0 25. Juni 1996 (25.06.96) DE 196 35 569.9 2. September 1996 (02.09.96) DE 196 54 574.9 27. Dezember 1996 (27.12.96) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): GSF - FORSCHUNGSZENTRUM FÜR UMWELT UND GESUNDHEIT GMBH [DE/DE]; Ingolstädter Landstrasse 1, D-85764 Oberschleißheim (DE). BAYER AG [DE/DE]; D-51368 Leverkusen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHUBERT, Roland [DE/DE]; Dachauer Strasse 479, D-80993 München (DE). SANDERMANN, Heinrich [DE/DE]; Rottenbucherstrasse 36, D-81377 München (DE). ERNST, Dietrich [DE/DE]; Am Schloßpark 28, D-82131 Gauting (DE). HAIN, Rüdiger [DE/DE]; Talstrasse 53a, D-40764 Langenfeld (DE). FISCHER, Regina [DE/DE]; Stockdorferstrasse 50, D-81475 München (DE).		(74) Anwalt: MAIWALD, Walter; Maiwald & Partner, Poccistrasse 11, D-80336 München (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: OZONE-INDUCED GENE EXPRESSION IN PLANTS (54) Bezeichnung: OZON-INDUZIERTE GENEXPRESSION IN PFLANZEN (57) Abstract <p>The present invention relates to new DNA sequences, a method for producing new plants which contain a new DNA sequence, the coding sequence thereof being expressed after ozone induction. The invention also relates to said new plants and the use of DNA sequences to produce ozone-responsive gene expression in plants and plant cells. Moreover, it relates to a new promoter, the specificity thereof being increased by removal of the ozone response capacity thereof.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die vorliegende Erfindung betrifft neue DNA-Sequenzen, eine Methode zur Erzeugung neuer Pflanzen, die eine neue DNA-Sequenz enthalten, deren kodierende Sequenz nach Ozon-Induktion exprimiert wird, diese neuen Pflanzen sowie die Verwendung der DNA-Sequenzen zur Erzeugung Ozon-responsiver Genexpression in Pflanzen und Pflanzenzellen. Andererseits betrifft die vorliegende Erfindung einen neuen Promotor, dessen Spezifität durch Beseitigung seiner Ozon-Responsivität erhöht ist.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

- 1 -

Ozon-Induzierte Genexpression in Pflanzen

5 Die vorliegende Erfindung betrifft neue DNA-Sequenzen, eine
Methode zur Erzeugung neuer Pflanzen, die eine neue DNA-Sequenz
enthalten, deren kodierende Sequenz nach Ozon-Induktion expri-
miert wird, diese neuen Pflanzen sowie die Verwendung der DNA-
Sequenzen zur Erzeugung Ozon-responsiver Genexpression in
10 Pflanzen und Pflanzenzellen. Andererseits betrifft die vorlie-
gende Erfindung einen neuen Promotor, dessen Spezifität durch
Beseitigung seiner Ozon-Responsivität erhöht ist.

Die Ozonkonzentrationen in der unteren Troposphäre über den
15 Kontinenten der Nördlichen Hemisphäre haben sich im Laufe der
letzten hundert Jahre in Folge verstärkter industriellen Akti-
vitäten ständig erhöht (Volz and Kley (1988) Nature 332, 240-
242). Inzwischen erreichen die Ozonwerte vorübergehende Spit-
zenkonzentrationen von 100 nl/l bis 200 nl/l in Europa und
20 Nordamerika (Krupa et al. (1995) Environ. Pollut. 87, 119-126).

Die Phytotoxizität des Luftschadstoffes Ozon ist gut untersucht
und dokumentiert; z.B. in Heagle (1989) Annu. Rev. Phytopathol.
27, 397-423; Heath (1994) In: Alscher, Wellburn (ed) "Plant
25 responses to the gaseous environment", pp. 121-145, Chapman &
Hall, London. Eine verringerte Nettophotosynthese und ver-
stärkte frühzeitige Seneszenz sind im allgemeinen das Ergebnis
einer solchen Ozonbelastung, die dadurch geringeres Pflanzen-
wachstum und niedrigere Ernteerträge zur Folge hat.

30

Obwohl Ozon mittels Diffusion durch offene Stomata in die
Pflanzenzelle eindringt, ist die Ozonkonzentration in den
Interzellularräumen des Blattes fast gleich Null, unabhängig
von der Umgebungs-Ozonkonzentration (Laisk et al. (1989) Plant
35 Physiol. 90, 1163-1167). Es wird derzeit angenommen, daß Ozon
rasch mit Bestandteilen der Zellwände und des Plasmalemmas
reagiert und in reaktive Sauerstoffspezies wie Superoxid-
Anionen, Hydroxylradikale und Wasserstoffperoxid, die in Ozon-
behandeltem Pflanzenmaterial unter Verwendung von Elektronen-

- 2 -

spinresonanzspektroskopie detektiert wurden, umgewandelt wird (Mehlhorn et al. (1990) *Physiologia Plantarum* 79, 377-383). Der sogenannte "oxidative burst", d.h. das rasche Entstehen einer relativ hohen Menge an reaktiven Sauerstoffspezies, kann durch
5 Veränderung der Permeabilität der Plasmamembran, Inaktivierung von redoxsensitiven Proteinen und verstärkte Lipidperoxidation zu einer dramatischen Störung der normalen Zellfunktion führen.

Jüngste Untersuchungen zeigten, daß in Ozon-behandelten Pflanz
10 zen eine verstärkte Biosynthese unspezifischer Abwehrenzyme, deren Aufgabe in dem Schutz lebender Zellen vor Schädigung durch oxidativen Streß besteht, stattfindet (Kangasjärvi et al. (1994) *Plant, Cell and Environment* 17, 783-794). Dennoch ist die für die Ozon-induzierte Genaktivierung verantwortliche
15 Signaltransduktionskette, die die entsprechende Information über die Bildung apoplastischer reaktiver Sauerstoffspezies in den Zellkern trägt, bis heute nicht verstanden. Derzeit werden verschiedene Faktoren, wie Anstieg der Calciumkonzentration im Cytosol (Price et al. (1994) *The Plant Cell* 6, 1301-1310), Bil-
20 dung von Salicylsäure (Klessig and Malamy (1994) *Plant Mol. Biol.* 26, 1439-1458) und the Phytohormone Jasmonsäure (Farmer (1994) *Plant Mol. Biol.* 26, 1423-1437) und Ethylen (Ecker (1995) *Science* 268, 667-674), als mögliche, durch oxidativen Streß verursachte Signalverbindungen, die generell an pflanz-
25 lichen Abwehrreaktionen beteiligt sind, diskutiert.

In Untersuchungen mit Ozon-begasten Tabakpflanzen konnte gezeigt werden, daß Ozon eine verstärkte Expression verschiedener Krankheitsresistenzgene, nämlich einiger PR-(Pathogenesis-
30 related)-Proteine, verursacht (Ernst et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 20, 673-682; Ernst et al. (1996) *J. Plant Physiol.* 148, 215-221; Eckey-Kaltenbach et al. (1994) *Plant Physiol.* 104, 67-74). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß ein von Ozon verursachter oxidativer Streß die Expression und Regulation
35 pflanzlicher Abwehrgene in ähnlicher Weise beeinflusst, wie er für Pathogenbefall beschrieben wurde. Gegenwärtig stehen nur sehr begrenzte Informationen über cis-Regulationselemente und Transkriptionsfaktoren, die möglicherweise an der Kontrolle der Genexpression unspezifischer Abwehrgene als Antwort auf ver-

- schiedene Umwelteinflüsse beteiligt sind, zur Verfügung (Lee et al. (1994) Eur. J. Biochem. 226, 109-114). Allerdings lassen bisherige Ergebnisse vermuten, daß im Fall der für die PR-Proteine kodierenden Gene getrennte oder zumindest nur teilweise überlappende Signaltransduktionswege existieren (Somssich (1994) In: Nover (ed) "Plant promoters and transcription factors", pp. 163-179, Springer-Verlag, Berlin; Dolferus et al. (1994) Plant Physiol. 105, 1075-1087).
- 10 Für die Aktivität der an der Phytoalexinsynthese beteiligten Stilbensynthase (STS) ist ebenfalls bekannt, daß sie in adulten Pflanzen durch Umweltstressfaktoren, wie z.B. Pathogenbefall (Langcake (1981) Physiol. Plant Pathol. 18, 213-226), UV-Licht (Fritzscheier and Kindl (1981) Planta 151, 48-52) und Ozon (Rosemann et al. (1991) Plant Physiol. 97, 1280-1286) induziert wird. Im Gegensatz dazu wurde in Keimlingen ein konstitutives Expressionsmuster beobachtet (Sparvoli et al. (1994) Plant Mol. Biol. 24, 743-755).
- 20 Stilbensynthaseenzyme katalysieren die Synthese von Stilbenen wie Resveratrol bzw. Pinosylvin aus einem Molekül p-Cumaroyl-CoA bzw. Cinnamoyl-CoA und drei Einheiten Malonyl-CoA. Sowohl Resveratrol als auch Pinosylvin besitzen Phytoalexineigenschaften und antifungale Aktivität und haben als Phytoalexine zusammen mit anderen aus dem Phenylpropanstoffwechsel abgeleiteten Stilbenen eine wichtige Funktion in der Abwehr von Krankheitserregern (Hart (1981) Annu. Rev. Phytopathol. 19, 437-458).
- STS-Gene kommen in einigen nicht miteinander verwandten Pflanzenspecies, wie z.B. Erdnuß (Schröder et al. (1988) Eur. J. Biochem. 172, 161-169), Weinrebe (Hain et al. (1993) Nature 361, 153-156) und Kiefer (Fliegmann et al. (1992) Plant Mol. Biol. 18, 489-503), vor und sind in größeren Genfamilien, bestehend aus sechs oder mehr Genen, organisiert (Lanz et al. (1990) Planta 181, 169-175; Wiese et al. (1994) Plant Mol. Biol. 26, 667-677).

Experimente mit transgenen Tabakzellen deuteten darauf hin, daß die Expression der Stilbensynthase hauptsächlich auf Transkrip-

- 4 -

tionsebene reguliert wird und die Streß-induzierte Signaltransduktionskette in verschiedenen Pflanzenspezies im Laufe der Evolution konserviert worden ist (Hain et al. (1990) Plant Mol. Biol. 15, 325-335).

5

STS-Gene aus Erdnuß (Arachis hypogaea) und Weinrebe (Vitis vinifera) wurden bereits isoliert (Schröder et al. (1988) supra bzw. Hain et al. (1993) supra) und in transgenen Pflanzen zur Expression gebracht (Hain et al. (1990) supra bzw. Hain et al. 10 (1993) supra).

Für Stilbensynthese kodierende DNA-Sequenzen sind beispielsweise aus der europäischen Patentschrift EP 0 309 862, der deutschen Patentanmeldung DE-A-41 07 396, der europäischen 15 Patentanmeldung 0 464 461 sowie der US-Patentschrift 5,500,367 bekannt. In diesen Dokumenten wird die Isolierung von Stilbensynthese-Genen und ihre Verwendung zur Erzeugung von transgenen Pflanzen beschrieben. Die resultierenden transgenen Pflanzen weisen eine erhöhte Resistenz gegenüber verschiedenen 20 Pflanzenschädlingen, wie Pilzen, Bakterien, Insekten, Viren und Nematoden auf. STS-Gene enthaltene Plasmide wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM), Mascheroder Weg 1B, D-38124 Braunschweig hinterlegt, so z.B. auch das Vst1-Gen aus Weinrebe in dem Plasmid pVst1 unter der Hinterlegungsnummer 25 DSM 6002 (DE-A-41 07 396, EP-A-0 464 461, US-Patent 5,500,367).

Während inzwischen auch die Verwendung von STS-kodierenden Sequenzen zur Erzeugung männlich steriler Pflanzen und veränderter Blütenfarbe beschrieben wurde (deutsche Patentanmeldung DE- 30 A-44 40 200), ist ein möglicher Zusammenhang zwischen STS-Genexpression und Ozon-Induktion bis heute vollkommen unerforscht.

Es gibt inzwischen verschiedene Hinweise darauf, daß es für eine möglichst effiziente Krankheitsresistenz basierend auf der 35 Expression von STS-Genen in transgene Pflanzen vorteilhaft ist, wenn die Expression des heterologes STS-Gens (bzw. der heterologen STS-Gene) in der Pflanze erst durch das angreifende Pathogen, d.h. erst durch die Interaktion von Pflanze und Krankheitserreger, stimuliert wird (Fischer and Hain (1994)

- 5 -

Current Opinion in Biotechnology 5, 125-130; Fischer (1994) "Optimierung der heterologen Expression von Stilbensynthasegenen für den Pflanzenschutz", Universität Hohenheim). Hierfür spricht besonders die Beobachtung, daß die Pathogen-induzierte STS-Genexpression lokal auf den Infektionsort begrenzt ist und transient stattfindet, d.h. die STS-Expression steigt relativ rasch auf ein Maximum an und klingt innerhalb von weniger als 48 h wieder ab (Hain et al. (1993) supra). Ebenso zeigten Untersuchungen mit transgenen Tabakpflanzen, in denen STS-Gene unter dem konstitutiven 35S RNA Promoter von Cauliflower Mosaic Virus zur Expression gebracht wurden, daß die in diesen Pflanzen erzielte Krankheitsresistenz geringer ist als in Pflanzen, die die gleichen Gene unter Kontrolle des Pathogen-induzierbaren homologen STS-Promoters nach Pilzbefall exprimierten (Fischer and Hain (1994) supra; Fischer (1994) supra). In jedem Fall ist es wünschenswert, daß die STS-Expression in transgenen (Kultur)pflanzen, die aufgrund der eingebrachten STS-Gene eine erhöhte Krankheitsresistenz aufweisen, alleine (und erst) durch den Befall von Pathogenen und nicht zusätzlich (bzw. bereits vorher) durch unerwünschte Umweltstressfaktoren, wie Ozon, aktiviert und kontrolliert werden.

Es ist somit eine wichtige Aufgabe der biotechnologischen Pflanzenschutzforschung, eine spezifischere Expression pflanzlicher Abwehrgene in Pflanzen zu realisieren, um auf diesem Wege molekularbiologische Strategien zur Erzeugung widerstandskräftigerer Pflanzen kontrollierbar und effizient umsetzen zu können. Ein wichtiger Aspekt hierbei ist das Ausschalten unerwünschter unspezifischer Umweltstimuli, wie z.B. die Induktion bestimmter Abwehrgene durch Ozon, UV-Licht, Schwermetalle, extreme Temperaturen und andere abiotische Stimuli.

Es ist somit eine wichtige Aufgabe der vorliegenden Erfindung, neue DNA-Sequenzen bereitzustellen, die unmittelbar an der Ozon-induzierten Expression von Resistenzgenen beteiligt sind.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, Möglichkeiten zur Beseitigung der Ozon-Induktion, d.h. zur Ausschaltung uner-

wünschter Stimulierung der Genexpression durch Ozon, aufzuzeigen.

- Desweiteren ist es eine wichtige Aufgabe der Erfindung, eine
5 DNA-Sequenz zu liefern, mit deren Hilfe Stilbensynthasogene
erst nach Kontakt der Pflanze mit einem Pathogen und nicht
durch Ozon-Stimulierung in transgenen Pflanzen zur Expression
gebracht werden können.
- 10 Wie eingangs bereits erwähnt wurde, ist eine stete Zunahme der
Ozonbelastung zu beobachten, die auch drastische Einflüsse auf
die Vegetation ausübt. Die Beobachtung und Bestimmung der Ozon-
konzentrationen in der Luft stellen bereits heute einen Schwer-
punkt der chemischen, physikalischen und biologischen Umwelt-
15 forschung dar. In diesem Zusammenhang stellen sogenannte Bio-
monitoren, mit deren Hilfe Ozonbelastungen und deren Folgen,
besonders der phytotoxischen Effekte, qualitativ und quanti-
tativ einfach zu bestimmen sind, ein wichtiges Instrument dar.
- 20 Somit liegt eine weitere Aufgabe der Erfindung in der Bereit-
stellung von DNA-Sequenzen, die zur Erzeugung gezielt Ozon-
induzierbarer Promotoren verwendet werden können. Mit Hilfe
solcher Promotoren können sog. Reportergene, deren Expression
durch einfache enzymatische Tests nachweisbar ist und die in
25 der biotechnologischen Forschung wohlbekannt sind, auf sehr
einfache und zuverlässige Weise als Biomonitoren Einsatz
finden.
- Weiter ist es eine Aufgabe der Erfindung, ein System bereitzu-
30 stellen, mit dessen Hilfe bestimmte Gene, deren Genprodukte in
der Lage sind, in Zellen reaktive Sauerstoffspezies zu entgif-
ten, im Bedarfsfall, also bei hoher Ozonbelastung, "angeschal-
tet" werden können. Genauer gesagt, soll durch die Bereitstel-
lung von DNA-Sequenzen, die für Ozon-responsive Genregulation
35 verantwortlich sind, eine Ozon-induzierbare Expression solcher
Gene, wie z.B. Katalase- und/oder Superoxiddismutasegene, mög-
lich werden. Somit ist es eine Aufgabe der Erfindung, DNA-
Sequenzen bereitzustellen, die zur Erzeugung eines durch Ozon
induzierbaren zellulären "Ozon-Schutzsystems" eingesetzt werden

- 7 -

können. Weitere Aufgaben der Erfindung ergeben sich aus der folgenden Beschreibung.

Diese Aufgaben werden durch die Gegenstände der unabhängigen
5 Ansprüche, insbesondere basierend auf der Bereitstellung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen, die unmittelbar an Ozon-induzierter Genexpression in Pflanzen beteiligt sind, gelöst.

Wir haben überraschend gefunden, daß eine bestimmte pflanzliche
10 Nukleinsäuresequenz unmittelbar an der Ozon-responsiven STS-Expression beteiligt ist. Während Experimente mit transgenen Tabakkeimlingen und -pflanzen, die das gebräuchliche Reporter-gen uidA aus E. coli, das für eine β -Glucuronidase kodiert, unter Kontrolle verschieden langer 5'-Deletionen des Vst1-
15 Promotors aus Weinrebe exprimieren, darauf hinweisen, daß zumindest einige für die Pilzinduktion verantwortliche cis-Elemente in dem Bereich des Promotors liegen, der die Basenpaare -140 bis -280 (vom Transkriptionsstart aus gerechnet) umfaßt (Fischer (1994) supra), ist der Bereich der Vst1-
20 Sequenz, der die Basenpaare -280 bis -430 umfaßt, für eine starke Aktivierung der Genexpression durch Ozon essentiell. Aufgrund unsere Experimente konnte gezeigt werden, daß ein Vst1-Promotor, der nur noch die Basenpaare bis einschließlich -280 besitzt (und dem somit die weiter upstream liegenden Vst1-
25 Promotorsequenzen fehlen) nicht mehr Ozon-induzibel ist. Wie oben erwähnt, ist dieser verkürzte Promotor aber trotzdem noch in der Lage, Pathogen-induzierte Genexpression der durch ihn kontrollierten kodierenden Sequenz zu vermitteln (siehe Fischer (1994) supra).

30 Unsere Analysen lassen desweiteren einen Zusammenhang zwischen der Behandlung von Pflanzen mit Ozon und einer verstärkten Biosynthese bzw. Freisetzung von Ethylen in den Pflanzenzellen vermuten. Demnach ist eine Mitwirkung Ethylen-responsiver
35 Elemente bei der Ozon-induzierten Genexpression nicht auszuschließen. Entsprechend kann unter Berücksichtigung bekannter cis-Elemente, die derzeit im Zusammenhang mit Ethylen-Responsivität diskutiert werden (Sessa et al. (1995) Plant Mol. Biol. 28, 145-153; Shinshi et al. (1995) Plant Mol. Biol. 27, 923-

932), eine Beteiligung des Sequenzbereichs des Vst1-Promotors, der die Basenpaare -283 bis -273 umfaßt, an einer Ozon-induzierten STS-Genexpression nicht ausgeschlossen werden.

- 5 Somit umfaßt der hier erstmals beschriebene Ozon-responsive DNA-Sequenzbereich die Basenpaare -270 bis -430 des Vst1-Promotors aus Weinrebe.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung die im Anspruch 1
10 definierte DNA-Sequenz (SEQ ID NO:1):

ACTTTTCGAG CCCCTTGAAC TGGAAATTAA TACATTTTCC ACTTGACTTT
TGAAAAGGAG GCAATCCCAC GGGAGGGAAG CTGCTACCAA CCTTCGTAAT
GTTAATGAAA TCAAAGTCAC TCAATGTCCG AATTTCAAAC CTCANCAACC
CAATAGCCAA T,

- 15 die für Ozon-induzierte Genexpression in Pflanzen essentiell ist. In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz um eine DNA-Sequenz, die aus Weinrebe, und besonders bevorzugt aus dem Stilbensynthase-Gen Vst1 aus Weinrebe (Basenpaare -270 bis -430), stammt.

20

- Die Erfindung betrifft weiter eine Promotorregion des Vst1-Gens, der mindestens die DNA-Sequenz, die die Basenpaare -270 bis -430 des Vst1-Gens umfaßt, fehlt. In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um eine Promotorregion des
25 Vst1-Gens, die nur den Sequenzbereich vom Translationsstart bis Basenpaar -270 des Vst1-Gens umfaßt. Besonders bevorzugt ist die Promotorregion, der der Sequenzbereich von -270 bis -430 des Vst1-Gens fehlt, in der Lage, eine pathogen-induzierbare Genexpression in Pflanzen zu vermitteln.

30

- Weiter betrifft die Erfindung chimäre Nukleinsäuremoleküle, in die die DNA-Sequenz der Basenpaare -270 bis -430 des Vst1-Gens oder mindestens ein Fragment dieses Sequenzbereichs eingeführt wurde. Besonders bevorzugt ermöglichen die chimären Nuklein-
35 säuremoleküle der Erfindung aufgrund der Anwesenheit der DNA-Sequenz der Basenpaare -270 bis -430 des Vst1-Gens oder mindestens eines Teilbereiches davon eine ozon-induzierbare Expression der in ihnen enthaltenen kodierenden Regionen in Pflanzen.

- 9 -

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle können beliebige Nukleinsäuremoleküle sein, insbesondere DNA- oder RNA-Moleküle, beispielsweise cDNA, genomische DNA, mRNA etc. Sie können natürlich vorkommende oder durch gentechnische oder chemische
5 Syntheseverfahren hergestellte Moleküle sein.

Durch die Bereitstellung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen, Promotorregionen, Nukleinsäuremoleküle oder Vektoren besteht nun die Möglichkeit, pflanzliche Zellen mittels gentechnolo-
10 gischer Methoden dahingehend zu verändern, daß sie eine ozon-induzierbare Merkmalsausprägung aufweisen. Weiter besteht nun die Möglichkeit, pflanzliche Zellen mittels gentechnologischer Methoden dahingehend zu verändern, daß sie ein oder mehrere Gene, die natürlicherweise aufgrund der Anwesenheit der DNA-
15 Sequenz gemäß Anspruch 1 oder einer davon ableitbaren oder einer mit ihr homologen DNA-Sequenz Ozon-induzierbar ist, nicht mehr durch Ozon induzierbar, bevorzugt im wesentlichen durch Pathogene induzierbar, ausprägen.

20 Ein besonderer Vorteil der Erfindung besteht darin, daß die Ozon-Induktion von natürlicherweise Ozon-induzierbaren Genen in Pflanzen und Pflanzenzellen durch Deletion der DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens eines Fragments davon in den Genen, die diese DNA-Sequenz oder eine davon ableitbare oder
25 eine mit ihr homologe DNA-Sequenz natürlicherweise enthalten, ausgeschaltet werden kann.

Ein weiterer Vorteil der Erfindung besteht darin, daß natürlicherweise nicht oder nicht wesentlich durch Ozon induzierbare
30 Gene unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen in Pflanzen und Pflanzenzellen Ozon-induzierbar ausgeprägt werden können. In einer bevorzugten Ausführungsform kontrolliert die Nukleinsäuresequenz, die für die Ozon-induzierbare Expression verantwortlich ist, oder mindestens ein Fragment
35 davon, die Expression von Genen, deren Genprodukte in der Lage sind, reaktive Sauerstoffspezies, die u. a. als Folge von Ozon in Pflanzenzellen entstehen können, zu entgiften. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform kontrolliert diese

- 10 -

Nukleinsäuresequenz die Expression von Katalase- und/oder Superoxiddismutase-Genen.

In einer alternativen Ausführungsform kontrolliert die für die
5 Ozon-induzierbare Genexpression verantwortliche DNA-Sequenz die
Expression von Reportergenen, die zur quantitativen und/oder
qualitativen Bestimmung von Ozonkonzentrationen und zur Bewer-
tung von Ozonauswirkungen, gemessen wird. Solche Reportergene
können z.B. das uidA-Gen aus E. coli, das für das Enzym β -
10 Glucuronidase (GUS) kodiert, Luciferase-Gene oder andere in der
pflanzlichen Biotechnologie gebräuchliche Gene sein. Geeignete
Reportergene sind jedem in dem Gebiet der Biotechnologie,
Biochemie oder Molekularbiologie ausgebildeten Fachmann
bekannt.

15 Weiter betrifft die vorliegende Erfindung Vektoren, welche die
oben genannten DNA-Sequenzen oder Promotorregionen oder Teile
davon enthalten. Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch
Vektoren, insbesondere Plasmide, Cosmide, Viren, Bakteriophagen
20 und andere in der Gentechnik gängige Vektoren, die die oben
beschriebenen erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle enthalten
und gegebenenfalls für den Transfer der erfindungsgemäßen
Nukleinsäuremoleküle auf Pflanzen bzw. Pflanzenzellen einge-
setzt werden können.

25 Ebenso betrifft die Erfindung transformierte Mikroorganismen,
wie Bakterien, Viren, Pilze, die die erfindungsgemäßen Nuklein-
säuresequenzen enthalten.

30 Es ist ebenso eine Aufgabe der Erfindung, neue Pflanzen und
Pflanzenzellen bereitzustellen, die sich durch das Fehlen der
Ozon-induzierbaren Expression von Genen, die natürlicherweise
in Pflanzen durch Ozon induziert werden, auszeichnen.

35 Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der für die Ozon-
Induktion verantwortlichen DNA-Sequenz und die Bereitstellung
von Promotoren, denen diese Sequenz fehlt und die aus diesem
Grund eine nicht mehr durch Ozon-induzierbare Genexpression der

- 11 -

durch sie kontrollierten Gene in Pflanzen und pflanzlichen Zellen ermöglichen, gelöst.

Die Aufgabe, Ozon-responsive Genexpression von Genen, die
5 natürlicherweise nicht durch Ozon induzierbar sind, zu ermöglichen, wird ebenfalls durch Bereitstellung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz gelöst. Dadurch werden Pflanzen und Pflanzenzellen bereitgestellt, die gezielt bei Ozon-Anwesenheit bestimmte Merkmale ausprägen.

10

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um transformierte Pflanzen und Pflanzenzellen, in denen Gene Ozon-induzierbar exprimiert werden, deren Genprodukte in der Lage, sind reaktive Sauerstoffspezies in Pflanzenzellen zu entgiften.

15 Besonders bevorzugt handelt es sich hierbei um Katalase- und/oder Superoxiddismutase-Gene. Alternativ können Pflanzen und Pflanzenzellen (einschließlich Protoplasten) erzeugt werden, die sog. Reportergene nach Induktion durch Ozon ausprägen und die ggf. als Biomonitorien eingesetzt werden
20 können.

Gegenstand der Erfindung sind somit transgene Pflanzen, die die oben beschriebenen rekombinanten Nukleinsäuremoleküle, integriert in das pflanzliche Genom vorliegend, enthalten. Bei
25 diesen Pflanzen kann es sich im Prinzip um jede beliebige Pflanze handeln. Vorzugsweise ist es eine monokotyle oder dikotyle Nutzpflanze. Beispiele für monokotyle Pflanzen sind die Pflanzen, die zu den Gattungen Avena (Hafer), Triticum (Weizen), Secale (Roggen), Hordeum (Gerste), Oryza (Reis),
30 Panicum, Pennisetum, Setaria, Sorghum (Hirse), Zea (Mais) gehören. Bei den dicotylen Nutzpflanzen sind u.a. zu nennen Baumwolle, Leguminosen, wie Hülsenfrüchte und insbesondere Alfalfa, Sojabohne, Raps, Tomate, Zuckerrübe, Kartoffel, Zierpflanzen, Bäume. Weitere Nutzpflanzen können Obst (insbe-
35 sondere Äpfel, Birnen, Kirschen, Weintrauben, Citrus, Ananas und Bananen), Ölpalmen, Tee-, Kakao- und Kaffeesträucher, Tabak, Sisal sowie bei Heilpflanzen Rauwolfia und Digitalis sein. Besonders bevorzugt sind die Getreide Weizen, Roggen,

- 12 -

Hafer, Gerste, Reis, Mais und Hirse, Zuckerrübe, Raps, Soja, Tomate, Kartoffel und Tabak.

Gegenstand der Erfindung ist ferner Vermehrungsmaterial von
5 erfindungsgemäßen Pflanzen, beispielsweise Samen, Früchte, Stecklinge, Knollen, Wurzelstöcke etc., sowie Teile dieser Pflanzen wie Pflanzenzellen, Protoplasten und Kalli.

Die Pflanzenzellen umfassen differenzierte und undifferenzierte
10 Pflanzenzellen (einschließlich Protoplasten), sowie Pflanzenzellen (einschließlich Protoplasten), in denen die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle integriert in das pflanzliche Genom oder als autonome Moleküle (einschließlich transiente Transformation) vorliegen.

15

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Wirtszellen, insbesondere prokaryontische und eukaryontische Zellen, die mit einem oben beschriebenen rekombinanten Nukleinsäuremolekül oder einem Vektor transformiert bzw. infiziert wurden,
20 und Zellen, die von derartigen Wirtszellen abstammen und die beschriebenen Nukleinsäuremoleküle oder Vektoren enthalten. Die Wirtszellen können Bakterien oder Pilzzellen sowie pflanzliche oder tierische Zellen sein.

25 Der vorliegenden Erfindung liegt außerdem die Aufgabe zugrunde, Verfahren zur Herstellung von Pflanzen und Pflanzenzellen aufzuzeigen, die sich durch Fehlen einer Ozon-induzierbaren Expression eines Gens, dessen Expression in Pflanzen und Pflanzenzellen natürlicherweise durch Ozon stimuliert wird,
30 auszeichnen.

Diese Aufgabe wird durch Verfahren gelöst, mit deren Hilfe die Erzeugung neuer Pflanzen und Pflanzenzellen, die diese natürlicherweise vorkommende Ozon-induzierte Genexpression
35 nicht aufweisen, möglich ist.

Der vorliegenden Erfindung liegt, wie oben bereits erwähnt, ebenfalls die Aufgabe zugrunde, Verfahren zur Herstellung von Pflanzen und Pflanzenzellen, die solche Gene, deren Expression

- 13 -

natürlicherweise nicht oder nicht wesentlich durch Ozon aktiviert wird, nach Ozon-Stimulierung exprimieren, bereitzustellen. Diese Aufgabe wird durch Verfahren gelöst, mit deren Hilfe Pflanzen und Pflanzenzellen erzeugt werden können, die
5 nach Einführung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen oder mindestens eines Teilbereiches davon in natürlicherweise nicht oder nur schwach ozoninduzierbare Gene diese Gene nach Ozon-Stimulierung exprimieren.

- 10 Zur Erzeugung solcher neuer Pflanzen bzw. Pflanzenzellen bieten sich verschiedene Methoden an. Zum einen können Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit Hilfe herkömmlicher gentechnologischer Transformationsmethoden derart verändert werden, daß die neuen Nukleinsäuremoleküle in das pflanzliche Genom integriert
15 werden, d.h. daß stabile Transformanten erzeugt werden.

Erfindungsgemäß werden Pflanzen bzw. Pflanzenzellen, die aufgrund des Fehlens der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz oder mindestens eines Fragmentes davon eine Ozoninduktion
20 des/der diese Sequenz natürlicherweise enthaltenden Gens/e nicht mehr zeigen, durch ein Verfahren hergestellt, das folgende Schritte umfaßt:

- a) Deletion der im Anspruch 1 definierten DNA-Sequenz bzw. einer Sequenz, die sich von dieser Sequenz ableiten läßt
25 oder die mit dieser Sequenz homolog ist, oder mindestens eines Fragments dieser Sequenz aus einem Gen, das nach der Deletion der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz Regulationselemente, die für die, ggf. regulierte, Transkription und Translation in Pflanzenzellen unentbehrlich
30 sind, mindestens eine kodierende Sequenz, sowie ggf. ein Terminationssignal für die Termination der Transkription und die Addition eines poly-A-Schwanzes an das entsprechende Transkript umfaßt;
- b) Transformation pflanzlicher Zellen mit dem in Schritt a) hergestellten Gen bzw. Nukleinsäuremolekül, und
35
- c) ggf. die Regeneration transgener Pflanzen und ggf. die Vermehrung der Pflanzen.

- 14 -

Alternativ kann in Schritt a) anstelle des Deletierens der für die Ozon-Induktion verantwortlichen Sequenz, diese Sequenz oder zumindest ein Teil davon, z.B. durch Mutagenese, inaktiviert bzw. blockiert werden und in inaktivierter Form in dem Gen
5 verbleiben. Unabhängig davon, auf welche Weise der Ozon-responsive Genbereich ausgeschaltet wird, können alle Manipulationsmaßnahmen mit Hilfe allgemein üblicher Methoden und Hilfsmittel der rekombinanten Gentechnik durchgeführt werden (siehe z.B. Sambrook et. al. (1989) Molecular Cloning: A
10 Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält das Nukleinsäuremolekül, das in Schritt b) auf Pflanzen bzw.
15 Pflanzenzellen übertragen wird, Regulationselemente, die eine z.B. Pathogen-induzierte Genexpression der kodierenden Sequenz ermöglichen.

Erfindungsgemäß werden Pflanzen bzw. Pflanzenzellen, die
20 aufgrund der Anwesenheit der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz, die für eine Ozon-induzierte Expression der sie enthaltenden Gene essentiell bzw. mitverantwortlich ist, oder mindestens eines Fragmentes dieser Sequenz, durch ein Verfahren hergestellt, das folgende Schritte umfaßt:

- 25 a) Einfügung mindestens einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz, die in Pflanzen eine Ozon-induzierte Genexpression bewirken kann, oder einer Sequenz, die sich von dieser Sequenz ableiten läßt oder die mit dieser Sequenz homolog ist, oder mindestens eines Fragments dieser Sequenz in
30 ein Gen, das natürlicherweise nicht oder nicht wesentlich Ozon-induzierbar exprimiert wird
- b) Transformation pflanzlicher Zellen mit dem in Schritt a) hergestellten Gen bzw. Nukleinsäuremolekül, das über
sämtliche natürlicherweise für die Expression in
35 Pflanzenzellen erforderlichen Elemente verfügt, und
- c) ggf. die Regeneration transgener Pflanzen und ggf. die Vermehrung der Pflanzen.

- 15 -

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Gen um ein Katalase-, Superoxiddismutase- oder ein gebräuchliches Reportergen.

- 5 Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, vorteilhafte Verwendungen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen aufzuzeigen.

- Die Erfindung umfaßt daher Verwendungen der neuen DNA-Moleküle
10 zur Erzeugung der oben beschriebenen erfindungsgemäßen Pflanzen und Pflanzenzellen, die sich entweder durch das Fehlen einer normalerweise durch Ozon beeinflussten Ausprägung eines bestimmten phänotypischen Merkmals auszeichnen, oder die gerade aufgrund der Anwesenheit der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz
15 durch Ozon-induzierte Merkmalsausprägung von nicht-transgenen Pflanzen und Pflanzenzellen unterscheiden, gelöst.

- Desweiteren umfaßt die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle zur Erzeugung von Pflanzen, die
20 sich durch eine erhöhte pathogeninduzierte, aber nicht-ozoninduzierte Krankheitsresistenz auszeichnen.

- Desweiteren betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen oder Fragmenten davon zur
25 Auffindung und Identifizierung von Ozon-responsiven Nukleinsäureelementen.

- Solche Ozon-responsiven Nukleinsäureelemente kann der Fachmann mit Hilfe gängiger molekularbiologischer Methoden, z.B. Hybridisierungsexperimenten oder DNA-Protein-Bindungsstudien identifizierten. Dabei wird z.B. in einem ersten Schritt aus einem Gewebe, welches mit Ozon behandelt wurde, die poly(A)⁺ RNA isoliert und eine cDNA-Bank angelegt. In einem zweiten Schritt werden mit Hilfe von cDNA-Klonen, die auf poly(A)⁺ RNA-Molekülen
30 aus einem nicht-behandelten Gewebe basieren, aus der ersten Bank mittels Hybridisierung diejenigen Klone identifiziert, deren korrespondierende poly(A)⁺ RNA-Moleküle lediglich bei Ozonbehandlung induziert werden. Anschließend werden mit Hilfe dieser so identifizierten cDNAs Promotoren isoliert, die über

- 16 -

Ozon-responsive Elemente verfügen. Bei der Untersuchung und Charakterisierung dieser isolierten Promotoren können die Nukleinsäuresequenzen und -moleküle nützliche Instrumente darstellen.

5
Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls Nukleinsäuremoleküle oder Fragmente davon, die mit einem der oben beschriebenen Nukleinsäuremoleküle oder einer der oben beschriebenen DNA-Sequenzen der Erfindung hybridisieren. Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet im Rahmen dieser Erfindung eine Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook et al (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold
10 Spring Harbor, New York, beschrieben sind.
15

Nukleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Molekülen hybridisieren, können z.B. aus genomischen oder aus cDNA-Bibliotheken isoliert werden.

20
Die Identifizierung und Isolierung derartiger Nukleinsäuremoleküle kann dabei unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle oder Teile dieser Moleküle bzw. der reversen Komplemente dieser Moleküle erfolgen, z.B. mittels
25 Hybridisierung nach Standardverfahren (siehe z.B. Sambrook et al, supra).

Somit betrifft die Erfindung ebenfalls die Verwendung einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz oder von Teilen davon zur Identifizierung und Isolierung homologer Sequenzen aus Pflanzen oder
30 anderen Organismen.

Als Hybridisierungssonde können z.B. Nukleinsäuremoleküle verwendet werden, die exakt oder im wesentlichen die erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen oder Teile dieser Sequenzen aufweisen. Bei den als Hybridisierungssonde verwendeten Fragmenten
35 kann es sich auch um synthetische Fragmente handeln, die mit Hilfe der gängigen Synthesetechniken hergestellt wurden und deren Sequenz im wesentlichen mit der eines erfindungsgemäßen

- 17 -

Nukleinsäuremoleküls übereinstimmt. Hat man Gene identifiziert und isoliert, die mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen hybridisieren, ist eine Bestimmung der Sequenz und eine Analyse der Eigenschaften erforderlich. Hierzu stehen dem

5 Fachmann eine Reihe von molekularbiologischen, biochemischen und biotechnologischen Standardverfahren zur Verfügung.

- Die mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen hybridisierenden Moleküle umfassen auch Fragmente, Derivate und
- 10 allelische Varianten der oben beschriebenen DNA-Moleküle, die eine Ozon-responsive Sequenz, in aktiver oder inaktivierter Form, enthalten oder die sich gerade dadurch auszeichnen, daß sie diese Sequenz nicht mehr aufweisen. Der Ausdruck "Derivat" bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die Sequenzen dieser
- 15 Moleküle sich von den Sequenzen der oben beschriebenen Nukleinsäuremoleküle an einer oder mehreren Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an Homologie zu diesen Sequenzen aufweisen. Homologie bedeutet dabei eine Sequenzidentität von mindestens 40%, insbesondere eine Identität von mindestens 60%,
- 20 vorzugsweise über 80% und besonders bevorzugt über 90%. Die Abweichungen zu den oben beschriebenen Nukleinsäuremolekülen können dabei durch Deletion, Addition, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.
- 25 Bei den Nukleinsäuremolekülen, die homolog zu den oben beschriebenen Molekülen sind und Derivate dieser Moleküle darstellen, handelt es sich in der Regel um Variationen dieser Moleküle, die Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion ausüben. Es kann sich dabei sowohl um natür-
- 30 licherweise auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen Organismen, oder um Mutationen, wobei diese Modifikationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese eingeführt wurden. Ferner kann es sich bei den Variationen um synthetisch hergestellte
- 35 Sequenzen handeln. Bei den allelischen Varianten kann es sich sowohl um natürlich auftretende als auch um synthetisch hergestellte oder durch rekombinante DNA-Techniken erzeugte Varianten handeln.

- 18 -

Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen bzw. deren Zellen stehen eine große Anzahl von Klonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für E. coli und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen 5 enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw. Die gewünschte Sequenz kann an einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird für die Transformation von E. coli-Zellen verwendet. Transformierte E. coli- 10 Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet und anschließend geerntet und lysiert. Das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analyseverfahren zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch- 15 molekularbiologische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation können die Plasmid-DNA gespalten und gewonnene DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden. Jede Plasmid-DNA-Sequenz kann in den gleichen oder anderen Plasmiden kloniert werden.

20 Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl bekannter Techniken zur Verfügung, wobei der Fachmann die jeweils geeignete Methode ohne Schwierigkeiten ermitteln kann. Diese Techniken umfassen die Transformation 25 pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, den direkten Gentransfer isolierter DNA in Protoplasten, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der 30 biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten. Dabei können sowohl stabile als auch transiente Transformanten erzeugt werden.

Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen 35 werden per se keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Ähnliches gilt für den direkten Gentransfer. Es können einfache Plasmide wie z.B. pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist die Anwesenheit eines selek-

- 19 -

tierbaren Markergens notwendig. Dem Fachmann sind die gängigen Selektionsmarker bekannt und es stellt für ihn kein Problem dar, einen geeigneten Marker auszuwählen. Gebräuchliche Selektionsmarker sind solche, die den transformierten Pflanzenzellen

5 Resistenz gegenüber einem Biozid oder einem Antibiotikum wie Kanamycin, G418, Bleomycin, Hygromycin, Methotrexat, Glyphosat, Streptomycin, Sulfonyl-Harnstoff, Gentamycin oder Phosphinotricin u.a. vermitteln.

- 10 Je nach Einführungsmethode gewünschter Gene in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z.B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muß mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der im Ti- und
- 15 Ri-Plasmid enthaltenen T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden.

- Werden für die Transformation Agrobakterien verwendet, muß die einzuführende DNA in spezielle Plasmide kloniert werden, und
- 20 zwar entweder in einen intermediären oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer
- 25 der T-DNA notwendige vir-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf Agrobacterium tumefaciens übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in E. coli als auch in Agrobakterien replizieren.
- 30 Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA-Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (Holsters et al (1978) Molecular and General Genetics 163, 181-187). Das als Wirtszelle dienende
- 35 Agrobakterium soll ein Plasmid, das eine vir-Region trägt, enthalten. Die vir-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet.

- 20 -

Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120 515; Hoekema in: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam (1985) Chapter V; Fraley et al 5 (1993) Crit. Rev. Plant. Sci., 4, 1-46 und An et al (1985) EMBO J. 4, 277-287 beschrieben worden.

Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit Agrobacterium tumefaciens oder 10 Agrobacterium rhizogenes kultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen ent- 15 halten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Die Regeneration der Pflanzen erfolgt nach üblichen Regenerationsmethoden unter Verwendung bekannter Nährmedien. Die so erhaltenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden. Andere Möglichkeiten 20 der Einführung fremder DNA unter Verwendung des biolistischen Verfahrens oder durch Protoplasten-Transformation sind bekannt (vgl. z.B. Willmitzer L. (1993) Transgenic Plants, in: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, eds.) Vol. 2, 627-659, 25 V.C.H. Weinheim - New York - Basel - Cambridge).

Während die Transformation dikotyler Pflanzen bzw. deren Zellen über Ti-Plasmid-Vektorsysteme mit Hilfe von Agrobacterium tumefaciens wohl etabliert ist, weisen neuere Arbeiten darauf 30 hin, daß auch monokotyle Pflanzen bzw. deren Zellen der Transformation mittels Agrobacterium-basierender Vektoren sehr wohl zugänglich sind (Chan et al (1993) Plant Mol. Biol. 22, 491-506; Hiei et al (1994) Plant J. 6, 271-282; Deng et al (1990) Science in China 33, 28-34; Wilmink et al (1992) Plant 35 Cell Reports 11, 76-80; May et al (1995) Bio/Technology 13, 486-492; Conner und Domiss (1992) Int. J. Plant Sci. 153, 550-555; Ritchie et al (1993) Transgenic Res. 2, 252-265).

- 21 -

Alternative Systeme zur Transformation von monokotylen Pflanzen bzw. deren Zellen sind die Transformationen mittels des biolistischen Ansatzes (Wan und Lemaux (1994) Plant Physiol. 104, 37-48; Vasil et al (1993) Bio/Technology 11, 1553-1558; 5 Ritala et al (1994) Plant Mol. Biol. 24, 317-325; Spencer et al (1990) Theor. Appl. Genet. 79, 625-631), die Protoplasten-Transformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Einbringung von DNA mittels Glasfasern.

10

Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanze in der üblichen Weise (siehe auch McCormick et al (1986) Plant Cell Reports 5, 81-84). Die resultierenden Pflanzen können normal 15 angezogen werden und mit Pflanzen, die die gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt werden. Die daraus entstehenden hybriden Individuen haben die entsprechenden phänotypischen Eigenschaften.

Es sollten zwei oder mehrere Generationen angezogen werden, um 20 sicherzustellen, daß das phänotypische Merkmal stabil beibehalten und vererbt wird. Auch sollten Samen geerntet werden, um sicherzustellen, daß der entsprechende Phänotyp oder andere Eigenarten erhalten geblieben sind.

25 Ebenso können nach üblichen Methoden transgene Linien bestimmt werden, die für die neuen Nukleinsäuremoleküle homozygot sind und ihr phänotypisches Verhalten hinsichtlich einer vorhandenen bzw. nicht vorhandenen Ozon-Responsivität untersucht und mit dem von hemizygoten Linien verglichen werden.

30

Selbstverständlich können Pflanzenzellen, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle enthalten, auch als Pflanzenzellen (einschließlich Protoplasten, Kalli, Suspensionskulturen u.ä.) 35 weiterkultiviert werden.

35

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle oder Teile dieser Moleküle bzw. der reversen Komplemente dieser Moleküle zur Identifizierung und Isolierung homologer Moleküle,

- 22 -

die Ozon-responsive Elemente umfassen aus Pflanzen oder anderen Organismen. Für die Definition des Begriffes "Homologie" siehe oben.

- 5 Die nachfolgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung.

10

BEISPIELE

Beispiel 1:

- Konstruktion der 5'-Deletionen des Vst1-Promotors als GUS-
15 Fusionskonstrukte in dem binären Vektor pPCV002

Der im folgenden als Promotor bezeichnete 5'-nicht-kodierende Sequenzbereich des Vst1-Gens aus Weinrebe besteht aus 1570 Basenpaaren. Dieser Promotor, dessen Sequenz u.a. aus der
20 deutschen DE 41 07 396 und Fischer (1994) supra bekannt ist, wurde mit Hilfe einer herkömmlichen Polymerase-Ketten-Reaktion unter Verwendung der folgenden Oligonukleotide als Primer und dem das vollständige Vst1-Gen enthaltende Plasmid pVst1 (DE-A-41 07 396; Fischer (1994) supra) als Template amplifiziert:

25

- 5'- CCCCAAGCTT CCCCGGATCA CATTCTATG AGT -3' (Primer 1, SEQ ID NO: 2)
- 5'- CGCGGATCCT CAATTGAAGC CATTGATCCT AGCT -3' (Primer 2, SEQ ID NO: 3).

30

- Die PCR-Reaktion wurde nach dem Protokoll von Perkin Elmer (Norwalk, USA) unter Verwendung der Nativen Taq DNA Polymerase von Perkin Elmer durchgeführt. Das unter üblichen PCR-Bedingungen amplifizierte DNA-Fragment wurde anschließend mit den
35 Restriktionsenzymen HindIII (diese Restriktionsschnittstelle ist am 5'-Ende von Primer 1 enthalten) und BamHI (diese Restriktionsschnittstelle ist am 5'-Ende von Primer 2 enthalten) nachgeschnitten und zusammen mit dem BamHI/EcoRI-Fragment aus dem Vektor pBI101.2 (Jefferson (1987) Plant Mol. Biol.

- Reporter 5, 387-405), welches das β -Glucuronidase-Reportergen (GUS, uidA) aus E. coli zusammen mit dem Terminationssignal des nos-Gens aus A. tumefaciens enthält, über die HindIII- und EcoRI-Restriktionsschnittstellen des pUC18-Polylinker in das
- 5 pUC18-Plasmid (Yanisch-Perron et al. (1985) Gene 33, 103-119; erhältlich z.B. von Boehringer Mannheim) subkloniert. Sämtliche Klonierungsschritte wurden unter Verwendung gängiger molekular-biologischer Techniken und Hilfsmittel durchgeführt (z.B. Sambrook et al. (1989) supra); Restriktionsenzyme und andere
- 10 für die Klonierungen eingesetzte Enzyme wurden von Boehringer Mannheim bezogen. Der resultierende pUC-Klon (pUC-Vst1/GUS) enthält somit eine Translationsfusion des Vst1-Promotors mit dem GUS-Gen, in der die ersten fünf STS-Codons im Leserahmen über eine BamHI-Schnittstelle mit dem GUS-Gen verbunden sind.
- 15 Der Sequenzbereich des Fusionsübergangs sowie die Sequenz des Vst1-Promotors wurden mit Hilfe der enzymatischen Kettenabbruch-Methode (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467) unter Verwendung des T7-Sequencing-Kit von Pharmacia (Freiburg) auf ihre Richtigkeit überprüft.
- 20 Die Klonierung der 5'-Deletionsmutanten in dem binären Vektor pPCV002 (Koncz and Schell (1986) Mol. Gen. Genet. 204, 383-396) wird im folgenden erläutert. Dabei wurden in den meisten Fällen pUC18-Subklone als Zwischenvektoren verwendet, da das kleinere pUC-Plasmid im Vergleich zu den relativ großen binären Vektoren
- 25 leichter zu handhaben ist.
- Die Plasmidbezeichnungen ergeben sich aus der ungefähren Länge des jeweiligen Promotorfragments, gerechnet vom Transkriptionsstart, der sich 73 Basenpaare entfernt vom Startkodon befindet (Hain et al. (1993) supra; Fischer (1994) supra). Die für die
- 30 schrittweise Verkürzung des Vst1-Promotor verwendeten Restriktionsschnittstellen sind auch in Abbildung 1 schematisch angegeben.
- p1500GUS: Das HindIII/EcoRI-Fragment, das den vollständigen STS-Promotor zusammen mit dem GUS-Gen enthält, wurde aus dem
- 35 oben beschriebenen Plasmid pUC-Vst1/GUS isoliert und zwischen die Restriktionsschnittstellen HindIII und EcoRI in den Polylinker von pPCV002 eingefügt.

- 24 -

- **p1060GUS**: Ein 1130 Bp-Promotorfragment wurde über die Restriktionsschnittstellen BamHI und SspI aus pUC-Vst1/GUS isoliert und in BamHI/HincII-linearisierten pUC18 kloniert (-> pUC1130). Anschließend wurde das GUS-Gen als BamHI/EcoRI-Fragment aus pUC-Vst1/GUS isoliert und zwischen die BamHI- und die EcoRI-Schnittstelle von pUC1130 kloniert. Schließlich wurde die Fusion über einen HindIII/EcoRI-Doppelverdau isoliert und über die gleichen Schnittstellen in den Polylinker von pPCV002 eingefügt.
- 10 - **p930GUS**: Das 1,0 kb-Promotorfragment wurde über die Restriktionsenzyme BamHI und HincII aus pUC-Vst1/GUS isoliert und über die gleichen Restriktionsschnittstellen in den Polylinker von pUC18 eingefügt (-> pUC1000). Danach erfolgte die Klonierung analog zu p1060GUS.
- 15 - **p740GUS**: Das ca. 1,6 kb lange HindIII/BamHI-Promotorfragment wurde aus dem Plasmid pUC-Vst1/GUS isoliert und mit dem Restriktionsenzym DraI verdaut. Das resultierende 810 Bp. lange BamHI/DraI-Fragment wurde anschließend über die Restriktionsschnittstellen BamHI und HincII in pUC18 kloniert (-> pUC810).
- 20 Anschließend wurde das GUS-Gen als BamHI/EcoRI-Fragment aus pUC-Vst1/GUS isoliert und zwischen die BamHI- und die EcoRI-Schnittstelle von pUC810 kloniert. Schließlich wurde die Fusion über einen HindIII/EcoRI-Doppelverdau isoliert und über die gleichen Schnittstellen in den Polylinker von pPCV002
- 25 eingefügt.
- **p550GUS**: pUC-Vst1/GUS wurde mit dem Restriktionsenzym AflII verdaut und die überhängenden 5'-Enden mit Klenow-Enzym (von Boehringer Mannheim; dNTPs ebenfalls von Boehringer Mannheim) nach Herstellerangaben aufgefüllt. Anschließend wurde mit dem
- 30 Restriktionsenzym BamHI nachgeschnitten und das entstandene 620 Bp-Promotorfragment in BamHI/HincII-linearisierten pUC18 ligiert (-> pUC620). Danach wurde die Klonierung wie u.a. für p1060GUS fortgeführt.
- **p500GUS**: Ein 570 Bp. langes Promotorfragment wurde über einen
- 35 BamHI/HaeIII-Doppelverdau aus pUC-Vst1/GUS isoliert und in BamHI/HincII-linearisierten pUC19-Vektor ligiert (-> pUC570). Danach erfolgte die weitere Klonierung wie zur Herstellung von u.a. p1060GUS.

- 25 -

- **p430GUS:** Das oben beschriebene Plasmid pUC1000 wurde unter Verwendung des Restriktionsenzym SnaBI linearisiert und mit HincII nachverdaut. Anschließend wurde der linearisierte Vektor religiert, wodurch die 500 Basenpaare des Promotors zwischen
5 -930 und -430 deletiert wurden (-> pUC500). Die weitere Klonierung verlief wie für pUC1060GUS.
- **p280GUS:** pUC-Vst1/GUS wurde mit dem Restriktionsenzym BanII verdaut, die überhängenden Enden mit Klenow-Enzym aufgefüllt und der linearisierte Vektor mit dem Restriktionsenzym BamHI
10 nachverdaut. Nach der Isolierung des 350 Bp. langen blunt end/BamHI-Promotorfragmentes wurde die Klonierung in Analogie zu p1060GUS fortgeführt.
- **p140GUS:** Der oben beschriebene pUC-Subklon pUC620 wurde mit den Restriktionsenzymen NsiI und PstI verdaut und der
15 linearisierte Vektor anschließend gereinigt und religiert. Dies resultierte in der Deletion der Promotorsequenzen von -550 bis -140 (-> pUC210). Anschließend wurde das GUS-Gen als BamHI/EcoRI- Fragment aus pUC-Vst1/GUS isoliert und zwischen die BamHI- und die EcoRI-Schnittstelle von pUC1130 kloniert.
20 Schließlich wurde die Fusion über einen HindIII/EcoRI- Doppelverdau isoliert und über die gleichen Schnittstellen in den Polylinker von pPCV002 eingefügt.
- **p40GUS:** Das 110 Bp-Promotorfragment wurde zusammen mit dem GUS-Gen durch einen NheI/EcoRI-Doppelverdau aus pUC-Vst1/GUS
25 isoliert und das Fragment anschließend in XbaI/EcoRI- linearisierten pPCV002 kloniert.
- **pAGUS:** Das Konstrukt p1500GUS wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI verdaut und der gereinigt Vektor anschließend religiert. Durch die BamHI-Schnittstelle, die der Vektor pPCV002
30 natürlicherweise in seiner multiplen Klonierungsstelle neben der HindIII-Schnittstelle enthält (Koncz and Schell (1986) supra) wurde auf diese Weise das gesamte Promotorfragment eliminiert.
- **p35SGUS:** Die Fusion des 35S RNA Promotors aus Cauliflower
35 Mosaic Virus mit dem GUS-Gen, die als positive Kontrolle diente, wurde als HindIII-Fragment aus dem Expressionsvektor pRT99GUS (Töpfer et al. (1988) Nucleic Acids Research **16**, 8725) isoliert und in die multiple Klonierungsstelle von pPCV002 eingefügt.

Beispiel 2:

Pflanzenmaterial, Pflanzentransformation und Regeneration
5 transgener Pflanzen

- Nicotiana tabacum cv. Petit Havana SR1 (Maliga et al. (1973) Nature New Biol. 244, 29-30) wurde als sterile Sproßkultur auf hormonfreiem 1/2 LS-Medium (Linsmaier and Skoog (1965) Physiol. Plant 18, 100-127) mit 1% Saccharose bei 26°C, 3000 Lux und einer 16-stündigen Photoperiode kultiviert. In Abständen von 6-8 Wochen wurden Sproßabschnitte auf frisches LS-Medium umgesetzt. Für die Transformation von Blattscheiben mit Agrobacterium tumefaciens (Horsch et al. (1985) Science 227, 1229-1231) wurden 2-3 cm lange Blätter von sterilen Sproßkulturen in Scheiben von 1 cm Durchmesser gestanzt und mit einer Suspension von Agrobakterien (ca. 10⁹ Zellen/ml YEB-Medium), die eines der oben genannten Plasmidkonstrukte enthielten, für 5 min. inkubiert. Die infizierten Blattstücke wurden auf hormonfreies LS-Medium für 2-3 Tage bei 26°C gehalten. Während dieser Zeit überwuchsen die Bakterien die Blattsegmente, die anschließend in flüssigem LS-Medium ohne Hormone gewaschen und auf LS-Medium mit Kanamycin (75 µg/ml; Sigma, München), Cefotaxim (500 µl/ml; Hoechst, Frankfurt) und Benzylaminopurin (BAP, 0,5 mg/l; Duchefa, Haarlem, Niederlande) gelegt wurden. Nach 2-3 Wochen waren transformierte Sprosse sichtbar, die auf hormonfreiem LS-Medium mit 75 µg/ml Kanamycin und 100 µg/ml Cefotaxim bewurzelt wurden.
- 30 Die für die Transformation der Tabakblattstücke eingesetzten Agrobakterienkulturen wurden wie folgt hergestellt. Zunächst wurden die oben beschriebenen pPCV002-Derivate in den E. coli Mobilisierungsstamm S17-1 (Simon et al. (1983) Bio/Technology 1, 784-790) eingebracht. Dabei erfolgten die Herstellung
- 35 kompetenter S17-1 E. coli-Zellen sowie die Transformation der kompetenten Zellen mit den entsprechenden Plasmiden nach Taketo (1988) Biochem. Biophys. Acta 949, 318-324 bzw. Hanahan (1983) J. Mol. Biol. 166, 557-580. Anschließend wurden der E. coli-Stamm S17-1, den jeweiligen binären Vektor enthaltend, und der

- 27 -

- Agrobacterium tumefaciens-Stamm GV3101 C58C1 Rif^r pMP90RK (Koncz and Schell (1986) *supra*) in entsprechenden Medien bis zur OD₅₈₀ = 1,0 angezüchtet. Für die Anzucht der E. coli-Bakterien wurde herkömmliches YT-Medium (Miller (1972)
- 5 Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Bacto-Tryptone 0,8% (w/v), Yeast-Extract 0,5% (w/v), NaCl 0,5% (w/v), pH 7,0) bei 37 °C und für die Anzucht der A. tumefaciens-Bakterien wurde YEB-Medium (Beef-Extract 0,5% (w/v), Yeast-Extract 0,1%
- 10 (w/v), Bacto-Peptide 0,5% (w/v), Saccharose 0,5% (w/v), MgSO₄ 2 mM, pH 7,2) bei 28 °C eingesetzt. Für die anschließende Konjugation wurden die Bakterien bei 1500 x g für 5 min. abzentrifugiert und zweimal in frisch angesetzter 10 mM MgSO₄-Lösung gewaschen. Anschließend wurden Donor (E. coli) und
- 15 Akzeptor (A. tumefaciens) im Verhältnis 1:1 gemischt und auf eine YEB-Agarplatte getropft. Nach 16-stündiger Inkubation bei 28 °C wurde der Bakterientropfen mit 10 mM MgSO₄-Lösung abgespült und 10⁻²-, 10⁻³- und 10⁻⁴-Verdünnungen auf YEB-Selektionsplatten ausplattiert. Aus einer Einzelkultur wurde
- 20 bei 28 °C eine für die Transformation von N. tabacum verwendete Agrobakterienkultur gezüchtet.

- Die transgenen Tabakspresse, die jeweils eine der oben beschriebenen Vst1-Promotor/GUS-Fusionen enthielten, wurden
- 25 steril über Sproßkultur vermehrt, teilweise in Erde überführt und im Gewächshaus unter normalen Bedingungen (22 °C, 60% relative Luftfeuchtigkeit, ca. 15.000 Lux) bis zur Blüte kultiviert. Die Blüten wurden durch Pergamenttüten vor Fremdbestäubung geschützt und reife Samenkapseln mit Samen der F1-
- 30 Generation nach 4-6 Wochen geerntet. Für biologische Tests im Gewächshaus wurde der Samen der F1-Generation auf LS-Medium mit 75 µg/ml Kanamycin ausgelegt. Dies erfolgte unter sterilen Bedingungen direkt aus der Kapsel oder nach Oberflächensterilisation (1. kurzes Waschen mit sterilem Wasser; 2. 2 min.
- 35 Inkubation in 70% Ethanol; 3. 10 min. Inkubation in 3% NaOCl (13% aktives Chlor); 4. dreimaliges Waschen mit Wasser; 5. Trocknung im Laminarstrom der Sicherheitswerkbank). Nach ca. 2-wöchiger Kultivierung auf LS-Medium mit 75 µg/ml Kanamycin bei 25-26 °C, 2000-3000 Lux und 60% Luftfeuchte waren kanamycin-

- 28 -

resistente Tabakkeimlinge und kanamycinsensitive Tabakkeimlinge eindeutig zu unterscheiden. Resistente Keimlinge zeigten im Gegensatz zu sensitiven Keimlingen ausgeprägtes Primärwurzelwachstum. Außerdem waren nur hier nach 2 Wochen neben den

5 Kotyledonen auch die Primärblätter zu erkennen. In diesem "Vierblattstadium" wurden die resistenten Fl-Keimlinge in Erde überführt, abgehärtet und unter geeigneten Bedingungen weiterkultiviert.

10

Beispiel 3:

Pflanzenanzucht, Ozonbehandlung und Blatternte

- 15 Für die anschließende Ozonbehandlung wurden transgene, kanamycinresistente Tabakkeimlinge zunächst von Agarplatten in Blumentöpfe mit einem 2:1-Gemisch von Standardsubstrat (Typ T / Frühstorfer / Lauterbach) mit Perlit überführt und für 3 Wochen in einer Klimakammer mit einem 12 h-Tag/Nacht-Zyklus, 15.000
- 20 Lux, 25 °C-Tagestemperatur, 20 °C-Nachttemperatur, 65-70% Luftfeuchte und gefilterter Luft inkubiert.
- Die Tabakpflanzen wurden anschließend einem einzigen Ozonpuls für 10 h ausgesetzt und dann in Schadstoff-freier, gefilterter Luft für 2-14 h inkubiert. Sämtliche Begasungsexperimente
- 25 wurden in geschlossenen Plexiglas-Boxen, die in die Klimakammer gestellt wurden, unter den angegebenen Klimabedingungen durchgeführt. Die Ozon-Behandlungen begannen immer um 9.00 Uhr morgens über den Tageszyklus hinweg. Das Ozon wurde durch elektrische Entladung in trockenem Sauerstoff gewonnen. Die
- 30 Dosierung und Analysen wurden unter Computer-Kontrolle durchgeführt (Langebartels et al. (1991) Plant Physiol. 95, 882-889). Die Tabakblätter einer Pflanze wurden von der Spitze der Pflanze aus nach unten gezählt und in die Blattnummern 1-10 klassifiziert, wobei das 1. Blatt eine Größe von mindestens 8
- 35 cm aufwies. Die Tabakblätter (klassifiziert von 1-10) wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Ozonbehandlung einzeln in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Beispiel 4: β -Glucuronidase-Aktivitätstest

5 Die fluorometrische Analyse der GUS-Enzymaktivität wurde streng nach Jefferson (1987) supra bzw. Jefferson et al. (1987) EMBO J. 6, 3901-3907 unter Verwendung von 4-Methyl-umbelliferyl-glucuronid (MUG, Sigma, München) durchgeführt. Die Konzentration des Produktes 4-Methylumbelliferon (MU) wurde mit einem
10 Fluoreszenzphotometer (Perkin Elmer LS-2 B Filterfluorimeter) in einer Quarz-Durchflußküvette gemessen. Die GUS-Aktivität in Pflanzenextrakten wurde in pmol MU x mg⁻¹ x min⁻¹ berechnet. Die Proteinkonzentration in den Tabakblattextrakten wurde nach Bradford (1976) Analyt. Biochem. 72, 248-254 bestimmt.

15 In parallel durchgeführten Experimente mit Ozon-behandelten Weinpflanzen und anschließenden Northern Blot Analysen konnte gezeigt werden, daß eine Begasung mit 0,2 µl/l und 0,4 µl/l Ozon in einer beträchtlichen Induktion der STS-Genexpression
20 auf mRNA-Ebene resultiert. Aus diesem Grund sollten STS-Gene aus Weinrebe besonders gut für die Identifizierung Ozon-responsiver DNA-Elemente geeignet sein. Es sei an dieser Stelle erwähnt, daß bislang solche Gene, die eine signifikante, zuverlässig meßbare Ozon-Induktion in Ozon-behandelten Pflanzen
25 im Vergleich zu unbehandelten Pflanzen erkennen lassen, nicht zur Verfügung stehen.

Um den Einfluß von Ozon auf Promotorebene analysieren zu können, wurden Fl-Tabakpflanzen (11 Wochen alt) der stabil
30 transformierten Tabaklinie, die die das Vst1-Promotor/GUS-Fusionskonstrukt mit der vollständigen Promotorregion (p1500GUS) enthält, in Ozonbegasungsexperimenten eingesetzt. GUS-Enzymaktivitäten wurden fluorometrisch in Rohextrakten von Blättern, die zu verschiedenen Zeitpunkten während einer 10-
35 stündigen Ozonbegasung mit verschiedenen Ozonkonzentrationen (0,1 µl/l Ozon, 0,2 µl/l Ozon bzw. 0,4 µl/l Ozon) und einer 14-stündigen Postinkubationsphase in schadstofffreier Luft geerntet wurden, bestimmt. Die in Abbildung 2 dargestellten Ergebnisse zeigen einen raschen durch Ozon induzierten Anstieg

- 30 -

der GUS-Aktivität im Vergleich zu Kontrollpflanzen, die nur in schadstofffreier Luft gehalten wurden. Danach verursachte die Behandlung mit 0,1 µl/l Ozon eine 11-fache Induktion und die Behandlung mit 0,2 bzw. 0,4 µl/l Ozon sogar eine bis zu 25-
5 fache Induktion der durch den STS-Promotor kontrollierten Expression des GUS-Gens 12 h nach Beginn der Ozon-Behandlung.

Für die Identifizierung von cis-regulatorischen Sequenzen, die für die beobachtete starke Ozoninduktion des STS-Promotors
10 verantwortlich sind, wurden die transgene Tabaklinien, die die oben beschriebenen 5'-Deletionen des Vst1-Promotors in Fusion mit dem bakteriellen GUS-Reportergen enthalten, als unabhängige F0-Pflanzen in Ozonbegasungsexperimenten analysiert. Die Primärregenerate wurden für mehrere Monate in Sterilkultur
15 kultiviert und über Sproßkultur vermehrt. Ebenso wurden F1-Tabakpflanzen (11 Wochen alt) dieser stabilen Transformanten auf Ozon-induzierte GUS-Expression untersucht.

Die transgenen Tabakpflanzen wurden für 10 h mit 0,1 µl/l Ozon
20 behandelt und anschließend für weitere 2 h in schadstofffreier Luft inkubiert. Die GUS-Aktivität wurde in Rohextrakten von mittelalten Blättern bestimmt und mit der Enzymaktivität in unbehandelten Kontrollpflanzen verglichen. Die Ergebnisse der fluorometrischen Analyse der GUS-Enzymaktivitäten sind in
25 Tabelle 1 dargestellt. Während die GUS-Aktivität mit zunehmender Verkürzung der Promotorregion von -1500 auf -430 sowohl in Ozon-behandelten Testpflanzen als auch in unbehandelten Kontrollpflanzen in einer leichten Abnahme der Ozon-Induktion resultiert (Induktionsfaktor sinkt von ca. 12 (-1500) auf ca.
30 10 (-430)), bewirkt die zusätzliche Deletion des Promotorbereichs zwischen -430 und -280 eine drastische Reduktion der GUS-Expression in Ozon-behandelten Testpflanzen. Während Pflanzen, in denen das GUS-Gens unter Kontrolle des -430-5'-Deletionspromotors steht, eine 10-fache Ozon-Induktion
35 gegenüber den Kontrollpflanzen zeigen, ist in Pflanzen, in die Expression des GUS-Gens durch den kürzeren -280-5'-Deletionspromotor kontrolliert wird, lediglich eine maximal 2-fache Induktion der GUS-Expression durch Ozon zu beobachten. Demzufolge enthält der Promotorbereich des Vst1-Gens aus

- 31 -

Weinrebe, der die Basenpaare -430 bis -280 umfaßt cis-aktive Elemente, die für eine ausgeprägte Ozon-induzierte Expression des STS-Gens essentiell sind.

- 5 Diese Ergebnisse wurden in Pflanzenzellen, die die obigen Konstrukte enthalten und in pflanzlichen Zellkulturen gezüchtet wurden, bestätigt.

10

15

20

25

30

35

ABBILDUNGEN und TABELLEN

Abbildung 1:

- 5 Restriktionskarte der Vst1-Promotor/GUS-Translationsfusion in dem Plasmid pUC-Vst1/GUS. Das Plasmid enthält eine Translationsfusion des Vst1-Promotors aus der Weinrebe mit dem GUS-Gen aus E. coli. Die für die Klonierung der 5'-Deletionsmutanten benutzten Restriktionsschnittstellen sind
10 eingezeichnet. nos ter = Terminationssignal des Nopalinsynthasegens aus Agrobacterium tumefaciens.

Abbildung 2:

- Kinetik der durch den Vst1-Promotor kontrollierten Induktion
15 der GUS-Expression in transgenen F1-Tabakpflanzen, die eine Translationsfusion des GUS-Gens mit dem vollständigen Vst1-Promotor aus Weinrebe enthalten (p1500GUS), durch verschiedene Ozonkonzentrationen.
Die GUS-Aktivitäten wurden fluorometrisch in Rohextrakten von
20 Tabakblättern (Blatt-Nr. 4) nach Jefferson (1987), supra, bestimmt. Die verschiedenen Erntezeitpunkte ergeben sich aus der Abbildung. Nach der 10-stündigen Ozonbehandlung erfolgte eine 14-stündige Postinkubation der Tabakpflanzen in schadstofffreier Luft. Kontrollpflanzen wurden nur in schadstofffreier Luft (ohne Ozonbegasung) gehalten. n = 3 oder 4; Mittelwerte ± Standardfehler; sämtliche Tests wurden als Doppelversuche durchgeführt.

Tabelle 1:

- 30 GUS-Enzymaktivitäten wurden fluorometrisch in Proteinextrakten von mittelalten Blättern von Ozon-behandelten (+) und unbehandelten (-) unabhängigen Tabaktransformanten bestimmt. Die transgenen Tabaklinien enthalten verschiedene 5'-Deletionen des Vst1-Promotors in Fusion mit dem bakteriellen GUS-
35 Reportergen. F0-Transformanten und F1-Pflanzen (11 Wochen alt) wurden für 10 h mit 100 nl/l Ozon begast und anschließend für 2 h in schadstofffreier Luft postinkubiert. Mittelwerte ± Standardfehler; sämtliche Analysen wurden als Doppelversuche durchgeführt.

Vstl-Promotor 5'-deletiert bis Position	untersuchte unabhängige, transgene Tabaklinien	GUS-Enzymaktivität [pmol MU min ⁻¹ mg ⁻¹ Protein]		Induktions- faktor
		+ Ozon	- Ozon	
-1500	1(F1)	735 ± 100	63 ± 7	11.7
-740	2(F1)	388 ± 59	30 ± 5	12.9
-550	3(F0)	126 ± 13	12 ± 3	10.5
	2(F1)	173 ± 25	15 ± 3	11.5
-500	5(F0)	148 ± 52	15 ± 6	9.9
-430	6(F0)	141 ± 38	14 ± 4	10.0
-280	6(F0)	22 ± 4	13 ± 3	1.7
	2(F1)	30 ± 3	15 ± 3	2.0
-140	2(F0)	12 ± 0.2	8 ± 3	1.5
	3(F1)	24 ± 3	15 ± 3	1.6
-40	3(F1)	24 ± 2	15 ± 3	1.6
+70	1(F1)	3.5 ± 1	3.5 ± 1	1.0

Tabelle 1

Tabelle 1:

GUS-Enzymaktivitäten wurden fluorometrisch in Proteinextrakten von mittelalten Blättern von Ozon-behandelten (+) und unbehandelten (-) unabhängigen Tabaktransformanten bestimmt. Die transgenen Tabaklinien enthalten verschiedene 5'-Deletionen des Vst1-Promotors in Fusion mit dem bakteriellen GUS-Reporterogen. F0-Transformanten und F1-Pflanzen (11 Wochen alt) wurden für 10 h mit 100 nl/l Ozon begast und anschließend für 2 h in schadstofffreier Luft postinkubiert. Mittelwerte \pm Standardfehler; sämtliche Analysen wurden als Doppelversuche durchgeführt.

Vst1-Promotor 5'-deletiert bis Position	untersuchte unabhängige, transgene Tabaklinien	GUS-Enzymaktivität [pmol MU min ⁻¹ mg ⁻¹ Protein]		Induktions- faktor
		+ Ozon	- Ozon	
-1500	1(F1)	735 \pm 100	63 \pm 7	11.7
-740	2(F1)	388 \pm 59	30 \pm 5	12.9
-550	3(F0)	126 \pm 13	12 \pm 3	10.5
	2(F1)	173 \pm 25	15 \pm 3	11.5
-500	5(F0)	148 \pm 52	15 \pm 6	9.9
-430	6(F0)	141 \pm 38	14 \pm 4	10.0
-280	6(F0)	22 \pm 4	13 \pm 3	1.7
	2(F1)	30 \pm 3	15 \pm 3	2.0
-140	2(F0)	12 \pm 0.2	8 \pm 3	1.5
	3(F1)	24 \pm 3	15 \pm 3	1.6
-40	3(F1)	24 \pm 2	15 \pm 3	1.6
+70	1(F1)	3.5 \pm 1	3.5 \pm 1	1.0

- 35 -

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: GSF - Forschungszentrum fuer Umwelt und Gesundheit GmbH
- (B) STRASSE: Ingolstaedter Landstr. 1
- (C) ORT: Oberschleissheim
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 85764

- (A) NAME: Bayer AG
- (B) STRASSE: Bayerwerk
- (C) ORT: Leverkusen
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 51368

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Ozon-Induzierte Genexpression in Pflanzen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 3

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRAEGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LAENGE: 161 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ACTTTTCGAG CCCCTTGAAC TGGAAATTAA TACATTTTCC ACTTGACTTT TGAAAAGGAG	60
GCAATCCCAC GGGAGGGAAG CTGCTACCAA CCTTCGTAAT GTTAATGAAA TCAAAGTCAC	120
TCAATGTCCG AATTTCAAAC CTCANCAACC CAATAGCCAA T	161

- 36 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LAENGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Sonstige Nucleinsaeure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

CCCCAAGCTT CCCCGGATCA CATTCTATG AGT

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LAENGE: 34 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Sonstige Nucleinsaeure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

CGCGGATCCT CAATTGAAGC CATTGATCCT AGCT

34

ANSPRÜCHE

5

1. Die pflanzliche DNA-Sequenz:

ACTTTTCGAG CCCCTTGAAC TGGAAATTAA TACATTTTCC ACTTGACTTT
TGAAAAGGAG GCAATCCCAC GGGAGGGAAG CTGCTACCAA CCTTCGTAAT
GTTAATGAAA TCAAAGTCAC TCAATGTCCG AATTTCAAAC CTCANCAACC
10 CAATAGCCAA T.

2. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1, die aus Weinrebe (Vitis vinifera) stammt.

15 3. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder 2, die in dem Stilbensynthase-Gen Vst1 natürlicherweise enthalten ist und den Basenpaaren -270 bis -430 entspricht.

4. Promoterregion des Stilbensynthasegens Vst1 aus
20 Weinrebe, der mindestens die DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 fehlt.

5. Promoterregion gemäß Anspruch 4, die nur den Sequenzbereich vom Translationsstart bis Basenpaar -270 umfaßt.
25

6. Promoterregion gemäß Anspruch 4 oder 5, die noch eine Pathogen-induzierte Genexpression in Pflanzenzellen vermittelt.

7. Chimäre Nukleinsäuremoleküle, in die die DNA-Sequenz
30 gemäß Anspruch 1 oder mindestens ein Fragment davon eingeführt wurde.

8. Chimäre Nukleinsäuremoleküle gemäß Anspruch 7, die eine Ozon-induzierbare Expression der in ihnen enthaltenen
35 kodierenden Regionen in Pflanzen ermöglichen.

9. Vektoren, welche die DNA-Sequenz, eine Promoterregion oder ein chimäres Nukleinsäuremolekül gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, oder Teile davon enthalten.

10. Transgene Pflanzen, die die DNA-Sequenz, eine Promoterregion oder ein chimäres Nukleinsäuremoleküle gemäß einem der vorangehenden Ansprüche oder eine davon abgeleitete DNA-Sequenz enthalten, sowie Teile dieser Pflanzen und deren Vermehrungsmaterial, wie Protoplasten, Pflanzenzellen, Kalli, Samen, Knollen oder Stecklinge, usw., sowie die Nachkommen dieser Pflanzen.

11. Transgene Pflanzen, die aufgrund des Fehlens der (im natürlichen Zustand vorhandenen) DNA-Sequenz
ACTTTTCGAG CCCCTTGAAC TGGAAATTAA TACATTTTCC ACTTGACTTT
TGAAAAGGAG GCAATCCAC GGGAGGGAAG CTGCTACCAA CCTTCGTAAT
GTTAATGAAA TCAAAGTCAC TCAATGTCCG AATTTCAAAC CTCANCAACC
CAATAGCCAA T
oder aufgrund des Fehlens mindestens eines Fragmentes davon keine Ozon-induzierbare Expression des natürlicherweise Ozon-induzierbaren Gens mehr aufweisen.

12. Pflanzen gemäß Anspruch 11, in denen die Ozon-induzierbare Expression von Krankheitsresistenzgenen stark reduziert ist.

13. Pflanzen gemäß Anspruch 11 oder 12, in denen die Ozon-induzierbare Expression von Stilbensynthasegenen, insbesondere des Vst1-Gens aus Weinrebe stark reduziert ist.

14. Pflanzen gemäß Anspruch 10, in denen aufgrund der Einführung der DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens eines Fragmentes davon eine Ozon-induzierbare Genexpression eines natürlicherweise nicht über diese DNA-Sequenz verfügenden Gens stattfinden kann.

15. Pflanzen gemäß Anspruch 14, in denen Ozon-induzierbare Expression von solchen Genen stattfinden kann, deren Genprodukte in Pflanzenzellen in der Lage sind, reaktive Sauerstoffspezies zu entgiften.

16. Pflanzen gemäß Anspruch 14 oder 15, in denen Ozon-induzierbare Expression von Katalase- oder Superoxiddismutase-Genen stattfinden kann.

5 17. Pflanzen gemäß Anspruch 14, in denen Ozon-induzierbare Expression von Reportergenen stattfinden kann.

18. Dikotyle Pflanzen gemäß einem der Ansprüche 10 bis 17, insbesondere Nutzpflanzen, wie Sojabohne, Raps, Tomate,
10 Zuckerrübe, Kartoffel, Baumwolle, Tabak, sowie Zierpflanzen oder Bäume.

19. Monokotyle Pflanzen gemäß einem der Ansprüche 10 bis 17, insbesondere Getreide wie Hafer, Weizen, Roggen, Gerste,
15 Reis, Hirse oder Mais.

20. Transgene Pflanzenzellen, einschließlich Protoplasten, die die DNA-Sequenz, eine Promoterregion oder ein chimäres Nukleinsäuremoleküle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9
20 oder eine davon abgeleitete DNA-Sequenz enthalten.

21. Pflanzenzellen, einschließlich Protoplasten, die aufgrund des Fehlens der (im natürlichen Zustand vorhandenen) DNA-Sequenz

25 ACTTTTCGAG CCCCTTGAAC TGGAAATTAA TACATTTTCC ACTTGACTTT
TGAAAAGGAG GCAATCCCAC GGGAGGGAAG CTGCTACCAA CCTTCGTAAT
GTTAATGAAA TCAAAGTCAC TCAATGTCCG AATTTCAAAC CTCANCAACC
CAATAGCCAA T

oder aufgrund des Fehlens mindestens eines Fragmentes davon
30 keine Ozon-induzierbare Expression des natürlicherweise Ozon-induzierbaren Gens mehr aufweisen.

22. Pflanzenzellen gemäß Anspruch 20, in denen aufgrund der Einführung der DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens
35 eines Fragmentes davon eine Ozon-induzierbare Genexpression eines natürlicherweise nicht über diese DNA-Sequenz verfügenden Gens stattfinden kann.

23. Verfahren zur Erzeugung transgener Pflanzen bzw. Pflanzenzellen, in denen die Ozon-induzierbare Expression von natürlicherweise Ozon-induzierbaren Abwehrgenen durch Deletion der DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens eines
5 Fragmentes davon in dem Abwehrgen, das diese DNA-Sequenz oder eine davon abgeleitete DNA-Sequenz natürlicherweise enthält, stark reduziert bzw. ausgeschaltet wird.

24. Verfahren gemäß Anspruch 23, in denen die Ozon-
10 induzierbare Expression von Stilbensynthasegenen stark reduziert bzw. ausgeschaltet wird.

25. Verfahren gemäß Anspruch 23 oder 24, in denen die Ozon-induzierbare Expression des Vst1-Gens aus Weinrebe stark
15 reduziert bzw. ausgeschaltet wird.

26. Verfahren zur Erzeugung transgener Pflanzen bzw. Pflanzenzellen, in denen ein oder mehrere Gene, deren Expression natürlicherweise nicht oder nicht wesentlich durch
20 Ozon induziert wird, aufgrund der Einführung der DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens eines Fragmentes davon durch Ozon induzierbar sind.

27. Verfahren gemäß Anspruch 26, in denen ein oder
25 mehrere Katalase- und/oder Superoxiddismutase-Gene durch Ozon induzierbar sind.

28. Verfahren gemäß Anspruch 26, in denen ein oder
mehrere Reportergene durch Ozon induzierbar sind.

30

29. Verfahren zur Beseitigung der Ozon-Induzierbarkeit von natürlicherweise Ozon-induzierbaren Abwehrgenen, die die DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder eine davon abgeleitete DNA-Sequenz natürlicherweise enthalten, durch Deletion oder
35 Inaktivierung der DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens eines Fragmentes davon.

30. Verfahren gemäß Anspruch 29, in dem das Gen ein Stilbensynthase-Gen ist.

- 41 -

31. Verfahren gemäß Anspruch 29 oder 30, in dem das Gen das Vst1-Gen aus Weinrebe ist.

32. Verfahren zur Erzeugung von Ozon-induzierbarer
5 Merkmalsausprägung in transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen durch Einfügen der DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens eines Fragmentes davon in solche Gene, die natürlicherweise nicht oder nicht wesentlich durch Ozon induzierbar sind.

10 33. Verwendung der DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder eines Fragmentes davon zur Auffindung Ozon-responsiver Sequenzbereiche in pflanzlichen Genen.

34. Verwendung der DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder
15 eines Fragments davon zur Erzeugung ozon-induzierbarer Merkmalsausprägung in transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen.

35. Verwendung der DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder eines Fragments davon zur Erzeugung von Pflanzen gemäß Anspruch
20 17, die als Biomonitoren zur quantitativen und/oder qualitativen Bestimmung von Ozon-Konzentrationen eingesetzt werden können.

36. Verwendung der Promotorregion gemäß einem der
25 Ansprüche 4 bis 6 zur Erzeugung erhöhter pathogen- aber nicht ozon-induzierbarer Krankheitsresistenz in transgenen Pflanzen.

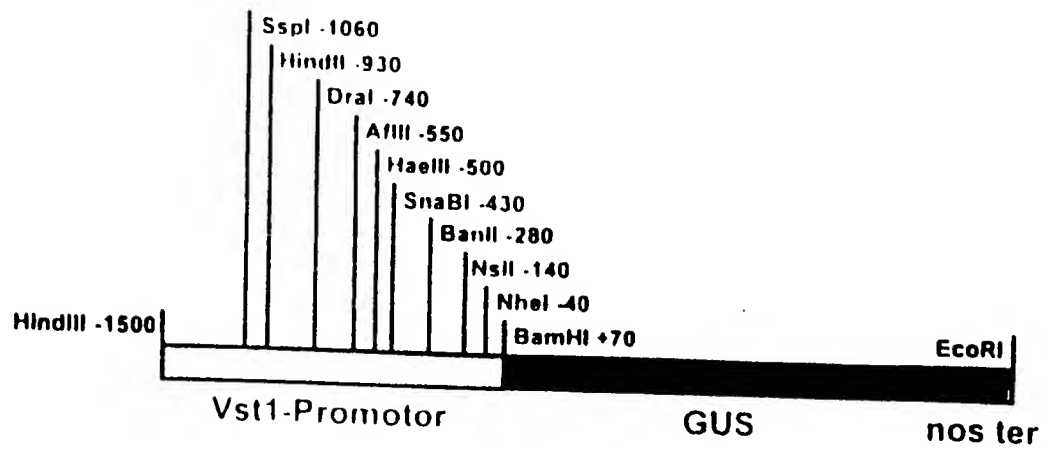


Abbildung 1

2/2

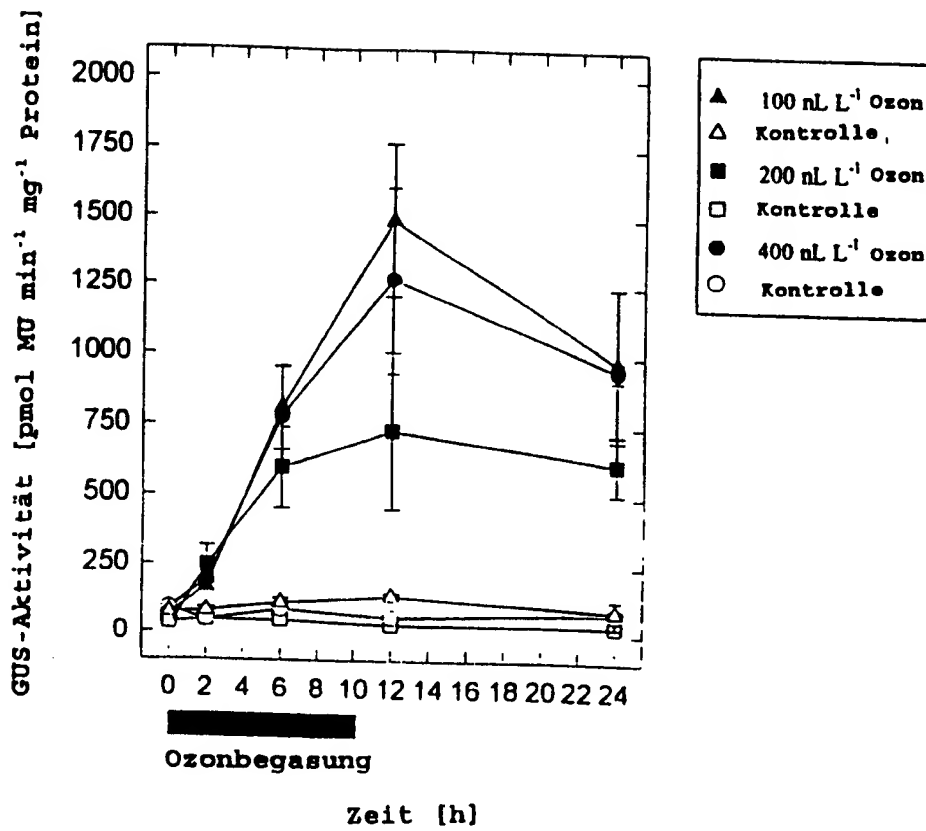


Abbildung 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/03187

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12N15/82 C12Q1/68 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 6 C12N C12Q A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FISCHER R.: "Optimierung der heterologen Expression von Stilbensynthasegenen für den Pflanzenschutz" December 1994, DOKTORARBEIT UNIVERSITÄT HOHENHEIM, STUTTGART XP002045218 cited in the application * see the whole document, especially page 90/91, 115 line 10-15, 121-124 ---	1-22
A	ROSEMAN D. ET AL.: "Biochemical plant responses to ozone" PLANT PHYSIOLOGY, vol. 97, no. 4, December 1991, pages 1280-1286, XP002045215 cited in the application see the whole document --- -/--	1-36

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 October 1997

Date of mailing of the international search report

11.11.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kania, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 97/03187

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KANGASJÄRVI, J. ET AL.: "Plant defence systems induced by ozone" PLANT, CELL AND ENVIRONMENT, vol. 17, 1994, pages 783-794, XP002045216 cited in the application see the whole document ---	1-36
P, X	SCHUBERT R. ET AL.: "An ozone-responsive region of the grapevine resveratrol synthase promoter differs from the basal pathogen-responsive sequence" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 34, no. 3, June 1997, pages 417-426, XP002045217 see the whole document -----	1-36

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intr Nationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/03187

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 C12N15/82 C12Q1/68 A01H5/00		
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 C12N C12Q A01H		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FISCHER R.: "Optimierung der heterologen Expression von Stilbensynthasegenen für den Pflanzenschutz" Dezember 1994, DOKTORARBEIT UNIVERSITÄT HOHENHEIM, STUTTGART XP002045218 in der Anmeldung erwähnt * siehe das ganze Dokument, bes. S. 90/91, 115 Z. 10-15, 121-24 ---	1-22
A	ROSEMAN D. ET AL.: "Biochemical plant responses to ozone" PLANT PHYSIOLOGY, Bd. 97, Nr. 4, Dezember 1991, Seiten 1280-1286, XP002045215 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument --- -/--	1-36
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 30. Oktober 1997		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 11.11.97
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Kania, T

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/03187

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	KANGASJÄRVI, J. ET AL.: "Plant defence systems induced by ozone" PLANT, CELL AND ENVIRONMENT, Bd. 17, 1994, Seiten 783-794, XP002045216 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-36
P,X	SCHUBERT R. ET AL.: "An ozone-responsive region of the grapevine resveratrol synthase promoter differs from the basal pathogen-responsive sequence" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 34, Nr. 3, Juni 1997, Seiten 417-426, XP002045217 siehe das ganze Dokument -----	1-36

high-throughput single-nucleotide polymorphism (SNP) screening via comparative DNA resequencing and, subsequently, used for large-scale parallel genotyping of SNPs.

2. Materials and methods

2.1. Sample preparation and labeling for SNP screening and genotyping

Human DNA sequences to be screened for SNPs were amplified either by genomic PCR or by RT-PCR [22]. As described by Wang et al. [13], ca. 2–2.5 µg PCR products were purified with Qiaquick strips or blocks (Qiagen), and fragmented with 0.2 units DNase I (Promega) at 37°C for 15 min. The fragmented DNA was labeled with terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) in a 40 µl reaction at 37°C for 1 h: 15 units TdT (GibcoBRL Life Technology), 12.5 µM biotin-N6-ddATP (DuPont NEN), 10 mM Tris–acetate (pH 7.5), 10 mM magnesium acetate, 50 mM potassium acetate.

Human SNPs to be assayed for genotyping were amplified and labeled with biotin as described in Wang et al. [13].

2.2. Chip hybridization

The labeled sample was denatured at ca. 96°C for 6 min and snap-cooled on ice for 2–5 min. The probe array (i.e. the chip) was pre-wetted with 6 × SSPET (0.9 M NaCl, 60 mM NaH₂PO₄, 6 mM EDTA (pH 7.4), 0.005% Triton X-100) and then hybridized with 195 µl hybridization solution at 44°C for 15 h on a rotisserie at ca. 40 rpm: 3 M tetramethylammonium-chloride (TMACl), 10 mM Tris–HCl (pH 7.8), 1 mM EDTA, 0.01% Triton X-100, 100 µg/ml herring sperm DNA, 450 pM denatured target DNA sample, 200 pM control oligonucleotide.

2.3. Post-hybridization washing and staining

The probe array was washed on a fluidics station (FS400, Affymetrix), three times with 1 × SSPET and then 10 × with 6 × SSPET at 22°C, followed by staining at room temperature with 195 µl staining solution on a rotisserie for 8 min at ca. 40 rpm: 2 µg/ml streptavidin R-phycoerythrin (Molecular Probes), 0.5 mg/ml acetylated BSA, 6 × SSPET. After staining, the probe array was washed 10 × again with 6 × SSPET at 22°C on the FS400.

2.4. Array scanning

The probe array was scanned on the GeneArray scanner (HP G2500A, Hewlett-Packard) at ca. 60 pixels

per probe cell (or feature) with a 570 nm filter [8]. Once the scan was completed, a grid was aligned on the scanned image and a digitized intensity table was generated for each of the probe features on the chip.

3. Results

3.1. Marker discovery

Human SNPs are expected to occur in the genome once per 300 nucleotides. Though the majority of these are rare variations occurring at a few percent or less in the population, informative SNPs with heterozygosity > 20% are expected to occur once per kilobase [13]. Comparative DNA sequencing among a small number of individuals can reveal a large number of highly informative biallelic polymorphisms [23]. A straightforward sequencing analysis of 1139 human STSs (279 kilobases) was embarked upon to compare genomic DNA of several unrelated individuals in parallel using standard gel-based DNA sequencing methodologies. This led to the identification of 279 candidate SNPs [13].

However, a high-throughput method for SNP discovery was sought both in the development of a large set of genetic markers and in the screening of DNA polymorphisms in genes of interest. High-density oligonucleotide arrays have been used for the detection of mutations in genes or genomes of interest, such as HIV reverse-transcriptase and protease [11], human mitochondrial DNA [8] and BRCA1 [10,12]. In all these cases, a variant detector array (VDA) has been used.

Fig. 1 shows a small section of a VDA for a human STS. Within the VDA, each column of four probes corresponds to the four bases substituted at the sequence position indicated, centered at the 13th position in a 25-mer (the 12 nucleotide flanking upstream and the 12 nucleotide flanking downstream are identical). Each column progressing rightward shifts the center and the endpoints of the oligonucleotide probe through the reference sequence used to design the array. The perfect-match probe corresponding to the reference sequence lights up with a stronger signal relative to the intensity of the three mismatch probes. Primers were designed to PCR-amplify the genomic DNA sequence from this region. The PCR product was purified, labeled and hybridized to the array. The top scan (Fig. 1(A)) shows hybridization to the VDA with labeled target from wild-type genomic DNA (homozygous G): the sequence in this region can be clearly read. In the bottom scan (Fig. 1(B)), the labeled target is amplified from an individual with a homozygotic A polymorphism (instead of G) at the indicated position. This target is mismatched (at the polymorphic base) to every probe surrounding the SNP. Therefore, a drop-off in



High-throughput polymorphism screening and genotyping with high-density oligonucleotide arrays

Ronald J. Sapolsky^a, Linda Hsie^b, Anthony Berno^b, Ghassan Ghandour^b,
Michael Mittmann^b, Jian-Bing Fan^{b,*}

^a *Stanford DNA Sequencing and Technology Center, Stanford University, Stanford, CA 94305, USA*

^b *Affymetrix, Inc., 3380 Central Expressway, Santa Clara, CA 95051, USA*

Abstract

A highly reliable and efficient technology has been developed for high-throughput DNA polymorphism screening and large-scale genotyping. Photolithographic synthesis has been used to generate miniaturized, high-density oligonucleotide arrays. Dedicated instrumentation and software have been developed for array hybridization, fluorescent detection, and data acquisition and analysis. Specific oligonucleotide probe arrays have been designed to rapidly screen human STSs, known genes and full-length cDNAs. This has led to the identification of several thousand biallelic single-nucleotide polymorphisms (SNPs). Meanwhile, a rapid and robust method has been developed for genotyping these SNPs using oligonucleotide arrays. Each allele of an SNP marker is represented on the array by a set of perfect match and mismatch probes. Prototype genotyping chips have been produced to detect 400, 600 and 3000 of these SNPs. Based on the preliminary results, using oligonucleotide arrays to genotype several thousand polymorphic loci simultaneously appears feasible. © 1999 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Polymorphism screening; Genotyping; Oligonucleotide arrays

1. Introduction

In the first decade of the next century, the complete DNA sequence of the human genome—three billion base pairs—will be fully determined. However, this information will represent only a reference sequence of the genome. Each individual genome is expected to vary at millions of positions scattered along the 23 pairs of chromosomes. Even without complete sequence information for the whole genome, highly reliable and efficient methods for DNA sequence polymorphism detection are valuable, providing direct access to the individual genetic information [1–3]. Meanwhile, molecular genetic analyses (e.g. whole-genome association studies) require a robust and cost-effective strategy for large-scale genotyping [4].

High-density oligonucleotide arrays, prepared by photolithographic synthesis on an impermeable glass substrate, have provided a fast and advantageous system for assaying DNA sequence variation via hybridization with fluorescent-labeled DNA targets [5–7]. Oligonucleotide arrays have already been utilized successfully in efforts to detect mutations and polymorphisms in individual genes, sequence-tagged sites (STSs) and genomes of interest [8–13], to monitor expression level of hundreds to thousands of genes simultaneously in various organisms [14–17], to physically map genomic clones into contiguous maps [18], to analyze in parallel the selected clones of a ‘two-hybrid’ screen [19], to map crossover points of meiotic recombination and replication origins in yeast (Winzeler, Stanford University, personal communication), to determine the function of genes in yeast with sequence-tag directed deletion [20], and to specify the genetic identity of bacterial pathogens [21]. In this paper, we will review how high-density oligonucleotide arrays can be used for

* Corresponding author. Tel.: +1-408-7315040; fax: +1-408-4810422; e-mail: jianbing_fan@affymetrix.com.